



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Trx1 y Nrx y su papel en la retina de mamíferos expuesta a hipoxia- isquemia perinatal.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en
el área de Química Biológica

Mariana Inés Holubiec
Director de tesis: Dr. Francisco Capani
Consejero de Estudios: Dra. María del Carmen Ríos de Molina
Lugar de trabajo: Instituto de investigaciones cardiológicas Prof. Dr. Alberto Taquini
(ININCA). UBA-CONICET

Buenos Aires, 2017

“In science, as in the playing card experiment, novelty emerges only with difficulty, manifested by resistance, against a background provided by expectation.”

Thomas Kuhn

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
1 Regulación y señalización <i>redox</i>	8
1.1 Modificaciones postraduccionales	10
1.2 Radicales Libres.....	10
1.3 ROS y RNS.....	11
2 Familia de las Tiorredoxinas	14
2.1 Estructura y mecanismos de acción	15
2.2 Localización subcelular	18
2.3 Funciones en mamíferos	20
3 Hipoxia-isquemia	23
4 El ojo y la retina	30
4.1 Retina: Tipos celulares.....	32
5 Tiorredoxinas en tejido retiniano	37
5.1 Tiorredoxinas en el ojo y la retina	37
6 Tratamientos con tiorredoxinas	38
6.1 Tratamientos con tiorredoxinas en retina	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
1 Hipótesis.....	41
2 Objetivos	41
MATERIALES Y MÉTODOS	
1 Procedimientos generales.....	43
1.1 consideraciones éticas	43
1.2 Animales.....	43
1.3 Alojamiento	44
1.4 Modelos de Hipoxia/Isquemia -Reoxigenación.....	44
2 Procesamiento y análisis de muestras provenientes de modelos animales.....	49
2.1 Hematoxilina-Eosina	49
2.2 Inmunohistoquímica (IHQ).....	50
2.3 Cuantificación Proteica.....	52
2.4 Western Blot (WT).....	53
3 Tratamiento con Tiorredoxinas y pruebas de neurodesarrollo.....	55
3.1 Tratamiento con tiorredoxinas	55
3.2 Evaluación de Neurodesarrollo.....	55
4 Procesamiento y análisis de muestras de cultivo celular.....	56
4.1 Cultivo Celular y Transfección	56
4.2 morfología en tres dimensiones.....	57
4.3 MTT	58
4.4 Inmunocitoquímica (ICC).....	58
4.5 Western Blot (WB).....	59
5 Análisis Estadístico	61
RESULTADOS	
1 Daño y modificaciones en la retina de murinos ocasionados por HI.....	64
1.1 Histología.....	64
1.2 Pérdida neuronal.....	65

1.3	Gliosia reactiva.....	67
2	Localización de TRX en la retina.....	70
2.1	Trx1, Trx2 y Nrj en retinas expuestas a HI.....	71
3	Rol de Trx1, Trx2 y Nrj en hipoxia-reoxigenación.....	74
3.1	Morfología de células ARPE-19.....	75
3.2	Viabilidad y proliferación.....	76
3.3	Marcadores gliales y neuronales.....	77
3.4	Trx1 y Nrj frente a hipoxia-reoxigenación.....	79
3.5	Niveles de Trx1 a lo largo de la reoxigenación.....	80
4	Importancia de Trx1 y Nrj en EPR.....	81
4.1	Eficiencia de transfección.....	81
4.2	Viabilidad/proliferación celular.....	82
4.3	Cambios en la morfología celular.....	82
4.4	Marcadores gliales y neuronales.....	84
5	Tratamiento con Trx1.....	85
5.1	Gliosia reactiva.....	85
5.2	Pérdida neuronal.....	86
5.3	Desarrollo neuromuscular y neuroconductual.....	87
DISCUSION		
1	La H-I genera daño a largo plazo en la retina de murinos.....	89
2	Hipoxia-reoxigenación en células ARPE-19.....	92
3	Proteínas de la familia de las TRX en la retina de murinos.....	95
4	Trx1, Trx2 y Nrj frente a la H-I.....	97
4.1	Trx1 frente a la H-I.....	97
4.2	Trx2 frente a la H-I.....	101
4.3	Nrj frente a la H-I.....	103
5	Posibles terapias.....	107
CONCLUSIONES		
1	Conclusiones.....	110
BIBLIOGRAFÍA		
1	Bibliografía.....	112
ABREVIATURAS		
1	Abreviaturas.....	124

AGRADECIMIENTOS

Luego de cinco años, que por veces han resultado largos, casi eternos, termino mi trabajo tesis con una mezcla de infinita felicidad, un poco de nostalgia y grandes expectativas para el futuro que me espera. Hoy solo me queda extender mi agradecimiento a mucha gente, a todos aquellos que han hecho esto posible. Entre ellos no puedo dejar de mencionar al Dr. Francisco Capani, quien me brindó un lugar en cual trabajar. También debo agradecerles a mis compañeros Ezequiel, Laura, Madeleine y Tamara, con quien compartí innumerables horas de trabajo. Quiero darle las gracias especialmente a mi consejera de estudios, María del Carmen Ríos de Molina por todas las correcciones de incontables informes, por las correcciones hechas al trabajo de tesis y por sus invaluable consejos y ayuda.

Quiero además darles las gracias especialmente a un grupo de personas que no solo me brindaron su ayuda en el laboratorio sino fuera de él. Con quienes compartí tanto experimentos como muchos momentos... y mucho tiempo...

A Juan y a Pablo, quiero agradecerles por compartir estos años de tesis conmigo, por su apoyo en todo momento, por el *brain storming* cuando había que planear experimentos o cuando algo no salía como esperábamos, por las “cenas” a la madrugada luego de trabajar por infinitas horas, las meriendas para descansar un poco y por esos fines de semana juntos, trabajando mucho y acercándonos aún más. Infinitas gracias por todas las enseñanzas y las correcciones. Fue y sigue siendo un placer trabajar con ustedes.

A Eva, al igual que Juan y Pablo, quiero agradecerle por enseñarme, corregirme y guiarme en este camino que fue mi tesis. Sin sus ideas y las tardes de planificación con un café en la mano nada de esto hubiera sido posible. Esta de más decir que en ella encontré a una persona excepcional que hizo de este camino uno más agradable de transitar.

A Romi, Stephy y Sol, gracias por estar presentes de forma incondicional. Steph y Ro, gracias por las correcciones que hicieron a la tesis, no podría haberla escrito sin su ayuda. Sol, gracias por tu ayuda en esos primeros experimentos, y por tu cuaderno de laboratorio que me sirvió hasta los últimos días.

Lisa, Susi, Daniel y Claudia, fue un placer conocerlos y poder trabajar con ustedes. Les agradezco toda la ayuda que me brindaron en los meses que

compartimos, son compañeros excepcionales. Daniel, vos sos el *lab-husband* ideal. Y gracias a Benni por ayudarme aprender alemán, no habría sido posible sin él.

A Santiago, gracias por compartir conmigo estos últimos meses (que casi parecieron años), y por su ayuda con la edición de las imágenes y de la tesis en general.

Grace, Mario y Cesar, gracias por darme la oportunidad de llegar hasta acá. Es más que obvio que no habría sido posible sin ustedes. Gracias por los sacrificios, por la ayuda y por soportarme en mis mejores y peores momentos. Toda mi familia ha estado conmigo durante todo este camino, su apoyo ha sido invaluable. Pero quiero agradecerle a mi prima María que siempre que la veo me pregunta cómo va mi trabajo de tesis y me alienta a seguir adelante. Tampoco puedo evitar recordar a mi ahijado y mis sobrinas, que vinieron al mundo durante estos años y a quienes continuo tratando de convertir a la ciencia.

A Ceci, Rober, Caro, Na y Amne, gracias por los momentos que compartimos desde tantos años atrás... y por sus palabras de aliento, las cuales a veces me han dado ánimos de seguir cuando estaba a punto de rendirme.

RESUMEN

El metabolismo celular normal implica diferentes formas de regulación que involucran el correcto crecimiento, homeostasis, funciones celulares y muerte celular. Durante las últimas décadas se ha demostrado que la regulación del estado *redox* juega un rol trascendental en el metabolismo, mientras que a su vez se encuentra bajo la regulación de diversos procesos metabólicos.

La superfamilia de las tioredoxinas está compuesta por diversas proteínas con distintas funciones y con bajo nivel de similitud en sus secuencias. Estas proteínas catalizan la reducción reversible de puentes disulfuro mediante el uso de los residuos de Cys presentes en su sitio activo. Tanto las Trx como las Nr_x se encuentran involucradas en procesos de transferencia de electrones, activación de factores de transcripción, apoptosis, proliferación y diferenciación celular.

La baja cantidad de oxígeno y glucosa que llega al SNC, debido a la hipoxia-isquemia (HI) afecta el metabolismo mitocondrial, lo que da comienzo a una cascada excito-oxidativa que resulta en daño al SNC. Luego de la reperusión comienzan a formarse radicales libres generando un desbalance *redox* que finalmente llevara a la muerte celular.

En el presente trabajo de tesis se han utilizado distintos modelos de HI con el fin de estudiar los cambios que ocurren en la expresión de las Trx y Nr_x y como estos pueden afectar distintas funciones en células de la retina de mamíferos.

Hemos podido comprobar que la HI y la posterior reoxigenación generan cambios en la expresión de Trx1 y Nr_x tanto en retinas provenientes de animales expuestos a HI perinatal como en células del epitelio pigmentario retiniano expuestas a hipoxia-reoxigenación. Por otro lado hemos podido comprobar que Trx1 juega un papel esencial en la viabilidad/proliferación de células del epitelio pigmentario retiniano mientras que el principal papel de Nr_x en estas células es el de la diferenciación.

ABSTRACT

Normal cell metabolism is involved in different regulatory pathways related to cell growth, homeostasis, cell functions and death. During the last decades it has been shown that redox state regulation plays a key role in metabolism, while it is itself under the regulation of different metabolic processes.

The thioredoxin superfamily includes several proteins with diverse functions and with low sequence identity. These proteins catalyze the reversible reduction of disulfide bonds using the Cys residues in their active sites. Both Trx and Nr_x are involved in electron transfer processes, transcription factor activation, apoptosis, proliferation and cell differentiation.

During hypoxia-ischemia (HI) low concentrations of oxygen and glucose arrive to the CNS affecting mitochondrial metabolism and starting an excito-oxidative cascade that results in damage to the CNS. After reperfusion free radicals are released, producing a redox imbalance that will ultimately lead to cell death.

In this thesis we used different HI models in order to study changes in Trx1 and Nr_x expression and how these changes may affect different cell functions in the retina.

HI and the following reoxygenation produce changes in the expression of Trx1 and Nr_x both in retinas from animals exposed to HI as well as in retinal pigmentary epithelial cells. Trx1 plays a key role in viability/proliferation while Nr_x's main role in these cells is related to differentiation.

INTRODUCCIÓN

1 REGULACIÓN Y SEÑALIZACIÓN *REDOX*

El metabolismo celular incluye diferentes formas de regulación de múltiples funciones celulares, tales como el crecimiento, la homeostasis y la muerte celular. Durante las últimas décadas se ha demostrado que la regulación del estado *redox* juega un rol decisivo en el metabolismo celular, estando esta misma regulación *redox* bajo el control de diversos procesos metabólicos (Geigenberger y col. 2014). El estado *redox* funciona como un sensor de las condiciones extracelulares, permitiendo a la célula responder adecuadamente a las condiciones de su entorno (Geigenberger y col. 2014). Asimismo, distintas especies reactivas del oxígeno (ROS; del inglés *Reactive Oxygen Species*) y especies reactivas del nitrógeno (RNS; del inglés *Reactive Nitrogen Species*) juegan un papel importante en procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular, de forma que sutiles cambios en el balance *redox* pueden generar cambios en el destino celular (Ye y col. 2015). Diversos trabajos han demostrado que el estado *redox* genera modificaciones postranscripcionales en proteínas relacionadas con el metabolismo celular; un ejemplo de esto es el efecto que ejerce sobre la Aconitasa, enzima que actúa en el ciclo de Krebs (Lushchak y col. 2014). A su vez, las modificaciones que sufre esta proteína generan cambios en otras moléculas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lushchak y col. 2014). Por otro lado, durante un proceso generador de cambios *redox* en el ambiente celular, el Factor Eritroide nuclear-2 (Nrf2; del inglés *Nuclear Eritroid Factor-2*), factor de transcripción

heterodimérico encargado de la activación de diversos genes frente a cambios en el estado de óxido-reducción, actúa sobre la lipogénesis, la beta-oxidación de ácidos grasos, la regeneración de la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) y la biosíntesis de purinas (Hayes y col. 2014). A partir de ésta, y otras evidencias, se podría comparar la señalización *redox*, es decir la producción de ROS y RNS y la consecuente oxidación o reducción de diversas moléculas dentro del ambiente celular, con la señalización dada por la fosforilación y desfosforilación de distintas moléculas que acarrearán con ellas complejas cascadas de señalización (Uys y col. 2014) (Fig. 1).

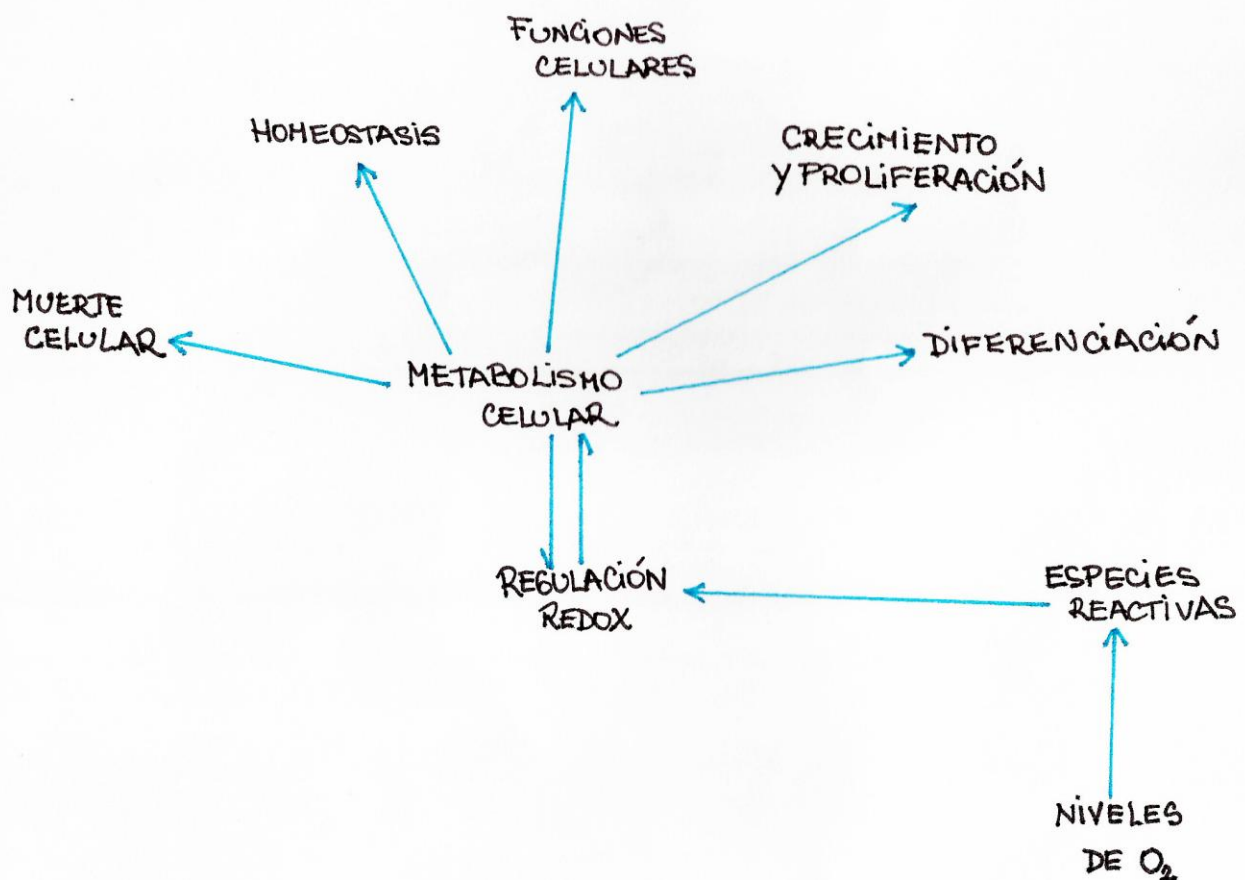


Figura 1: Esquema resumiendo las conexiones entre los eventos celulares normales, el metabolismo celular y la regulación redox y cómo estos se relacionan con los niveles de O_2 y la producción de especies reactivas.

1.1 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

1.1.1 S-glutationilación

En esta modificación postraducciona, una molécula de Glutathión (GSH) se adiciona a las Cys de distintas proteínas modificando de esta forma su peso y su carga, haciéndola más negativa (Uys y col. 2014). La oxidación de estos grupos tiol ocurre espontáneamente en presencia de ROS o RNS *in vitro*, mientras que se conocen diversas enzimas que catalizan esta reacción *in vivo* (Uys y col. 2014).

1.1.2 S-nitrosilación

La nitrosilación es una modificación postraducciona ubicua que regula la estructura y función de distintas proteínas. Durante esta modificación se adiciona un grupo funcional –NO a las Cys. Este fenómeno se encuentra regulado por nitrosilasas y denitrosilasas (Uys J.D. y col. 2014). Las nitrosilasas son enzimas que se encargan de utilizar –NO producido por la Óxido nítrico sintetasa (NOS; del Inglés *Nitric oxide synthetase*) para modificar grupos tiólicos (Jia J. y col. 2014).

1.2 RADICALES LIBRES

Un radical libre es una molécula que contiene al menos un electrón desapareado alrededor del núcleo de uno de sus átomos, por lo cual presenta una alta inestabilidad que se traduce en una incrementada reactividad química y en una vida media corta. Debido a su alta reactividad, cuando un radical libre interactúa con otra molécula, dona un electrón o sustrae sus electrones produciendo un nuevo radical, generando así una

reacción en cadena (Phaniendra y col. 2015). Los radicales libres se generan a partir del metabolismo celular. En condiciones normales, la principal fuente de radicales libres en una célula es la cadena de electrones (Chance y col. 1979; Cheeseman y col. 1993). Entre las fuentes de radicales libres podemos incluir a la mitocondria, los peroxisomas y el retículo endoplasmático, donde el consumo de oxígeno es alto (Phaniendra y col. 2015).

Los radicales libres pueden originarse de tres formas (Capani y col. 2001):

1. La ruptura homolítica de una unión covalente, de forma tal que cada parte de la molécula retenga uno de los dos electrones involucrados en la unión.
2. Pérdida de un electrón por una molécula.
3. Ganancia de un electrón por una molécula.

Entre los radicales libres presentes en los sistemas biológicos, los de mayor importancia son aquellos derivados del oxígeno y del nitrógeno (Gilbert y col. 1994). Estas moléculas, altamente reactivas, son producidas por reacciones de transferencia de electrones que pueden ser catalizadas tanto por enzimas como por metales de transición, o bien producirse espontáneamente (Cheeseman y col. 1993).

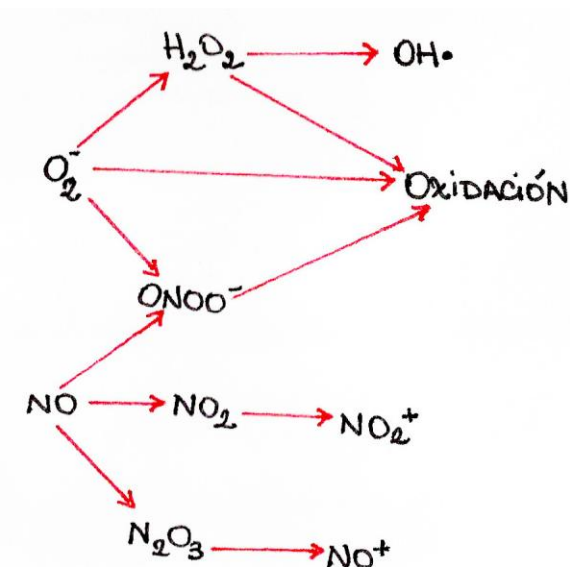
1.3 ROS Y RNS

Por años se ha considerado a las ROS y a las RNS como moléculas responsables del daño celular y causantes del deterioro del ambiente celular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que estas moléculas son de gran importancia para el funcionamiento normal de la célula (Del Río y col. 2015). Tanto las

ROS como las RNS se encuentran intrínsecamente relacionadas con la señalización *redox* e influyen en la diferenciación y la viabilidad celular (Sandalio y col. 2015), mediante su interacción específica con diferentes residuos proteicos (Ward y col. 2014).

Entre las ROS se encuentran los radicales libres tales como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\cdot OH$), al igual que sustancias no radicalarias como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2). Éstas son especies con alta actividad oxidativa que puede ser revertida, dentro de la célula, por agentes reductores (Westerblad y col. 2011). No todas las especies poseen la misma reactividad, siendo los radicales hidroxilo y peroxinitrito los más reactivos (Chance y col. 1979) (Fig. 2).

Las RNS incluyen radicales como el óxido nítrico ($NO\cdot$) y el dióxido nítrico ($NO_2\cdot$), y no radicales como el ácido nitroso (HNO_2) y el tetróxido de nitrógeno (N_2O_4) (Westerblad y col. 2011). El óxido nítrico es producido en células animales por medio de las NOS inducible (iNOS), NOS endotelial (eNOS) y la NOS neuronal (nNOS)



(Sandalio y col. 2015; Zhou y col. 2009) (Fig. 2). El $NO\cdot$ es un importante segundo mensajero intracelular capaz de estimular a la enzima guanilato ciclasa y a diferentes protein-quinasas (Sandalio. y col. 2015).

La mayor parte de las ROS se producen en la mitocondria. El radical superóxido se produce entre el complejo I

Figura 2: Esquema que muestra la interrelación en la formación de diferentes especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. A partir del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ se puede obtener tanto peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). A su vez el H_2O_2 da lugar a la formación de hidroxilo ($OH\cdot$). El óxido nítrico puede generar $ONOO^{\cdot-}$, dióxido de nitrógeno (NO_2) y anhídrido nitroso (N_2O_3).

y III de la cadena de transporte de electrones, en la cual un intermediario inestable pasa electrones al O_2 . Es por esto que, a mayor metabolismo aeróbico, mayor es la producción de este radical (Phaniendra y col. 2015). Por otro lado, el H_2O_2 se forma a partir de la acción de la superóxido dismutasa (SOD), que actúa formando H_2O_2 a partir del radical superóxido (Phaniendra y col. 2015). Otra fuente de ROS y RNS son los peroxisomas, ya que en ellos se producen H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y NO^{\bullet} . La beta-oxidación de ácidos grasos es el proceso metabólico que predominantemente produce H_2O_2 en esta organela (Phaniendra y col. 2015). Por otro lado, las enzimas pertenecientes al retículo endoplasmático también son capaces de generar ROS y RNS.

El exceso de ROS y RNS, junto con la disminución de antioxidantes (tanto enzimáticos, como no enzimáticos), produce un desbalance *redox* en el ambiente celular y daños a macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN) (Phaniendra y col. 2015, Ylä-Herttuala y col. 1999, Stadtman y col. 2000, Marnett y col. 2000). Además, las ROS y RNS son capaces de oxidar distintos aminoácidos en diferentes proteínas, lo cual puede conducir a su desnaturalización y a la pérdida de sus funciones como receptor, transportador o enzima, entre otras. Los residuos de metionina y cisteína son los más susceptibles a la oxidación por ROS/RNS, y son convertidos en metionin-sulfóxido y disulfuro, respectivamente (Phaniendra y col. 2015). Los lípidos de membrana, en particular los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles a la oxidación por radicales libres. La peroxidación de los lípidos de membrana da lugar a una disminución en la fluidez de la misma, al igual que a una inactivación de enzimas y receptores que se encuentran en ella (Phaniendra y col. 2015; Valko y col. 2007). La mitocondria es particularmente susceptible al ataque de ROS, ya que es la organela

donde mayor producción de los mismos hay. En cambio, el el ADN nuclear puede ser modificado tanto por ROS como por RNS en la misma medida (Phaniendra y col. 2015). Las ROS/RNS reaccionan con todos los componentes del ADN, causando diferentes alteraciones que incluyen rupturas de una o de ambas hebras (Phaniendra y col. 2015, Valko y col. 2007). Entre los aductos de pirimidinas que se pueden formar, se encuentran el timidínglicol, la 5-hidroxideoxiuridina y la 5-hidroxideoxicistidina. Por su parte, los aductos de purinas incluyen a la 8-hidroxideoxiguanosina, la 8-hidroxideoxiadenosina y la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina. En humanos, el ARN es más susceptible a daño por ROS/RNS que el ADN debido a que presenta una sola hebra, no posee mecanismo de reparación frente a la oxidación y carece de protección por proteínas asociadas (Valko y col. 2007).

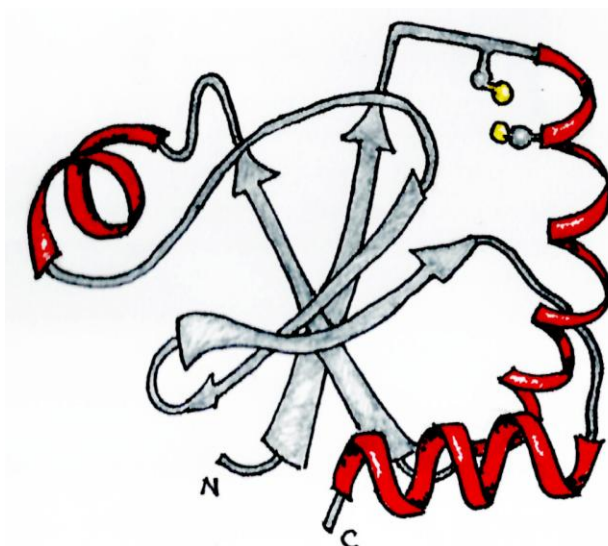
2 FAMILIA DE LAS TIORREDOXINAS

La superfamilia de las tiorredoxinas (TRX) está compuesta por diversas proteínas con distintas funciones y con bajo nivel de similitud en sus secuencias, y se caracterizan por presentar al menos un plegamiento característico (Pedone y col. 2010). Se pueden distinguir tres grandes grupos dentro de esta superfamilia, además de moléculas que se clasifican como “del tipo de las tiorredoxinas”, que incluyen a las Glutarredoxinas, las Peroxirredoxinas, las Nucleorredoxinas y las Tiorredoxinas propiamente dichas (Pedone y col. 2010).

La Tiorredoxina (Trx) fue descripta por primera vez por Meter Reichard y colaboradores, cuando la misma fue aislada como dador de hidrógeno de la enzima

ribonucleótido reductasa en *Escherichia coli* (*E.coli*) (Laurent y col. 1964). Estas proteínas son pequeñas reductasas de aproximadamente 12 KDa que presentan un motivo di-tiol, Cys-Gly-Pro-Cys, característico en su sitio activo, revelado en la década de 1960 cuando se secuenció la Trx por primera vez (Laurent y col. 1964). Se descubrió que la Trx no era solo un cofactor involucrado en la reducción de ribonucleótidos sino que constituía una proteína de suma importancia, que estaba involucrada en diferentes funciones como la defensa antioxidante, la modulación de señalización intracelular-extracelular y la regulación de factores de transcripción, entre otras.

La proteína Glutarredoxina (Grx) fue descubierta gracias a la caracterización de una cepa mutante de *E.coli* que carece de Trx, mientras que las Peroxirredoxinas (Prx) fueron descritas por primera vez como antioxidantes presentes en levaduras y se dividen en tres subfamilias de acuerdo al número y localización de sus sitios activos (Lillig y col. 2007, Lu y col. 2014a). Las Nucleorredoxinas (Nrx) fueron descritas recientemente en ratones, siendo similares a las Trx y altamente conservadas en mamíferos (Marchal y col. 2014).



2.1 ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN

El estudio de la TRX en diferentes organismos ha arrojado luz sobre su composición y sus funciones. Los

Figura 3: Estructura básica de las Tiorredoxinas. Se pueden observar 4 láminas beta (gris) rodeadas de 3 alfa hélices (rojo). El sitio activo con las dos cisteínas se encuentra marcado en amarillo.

miembros de esta familia de proteínas se caracterizan por presentar una estructura compuesta por cuatro láminas beta y tres alfa hélices rodeándolas (Fig. 3). Las Trx tienen, además, una lámina beta y una alfa hélice extras en el extremo N-terminal, mientras que las Prx presentan estructuras secundarias entre la segunda lamina beta y la segunda alfa hélice (Pedone y col. 2010; Lu y col. 2014b; Berndt y col. 2008).

Las Trx y Grx son proteínas de pequeño tamaño que presentan en su sitio activo un disulfuro y cumplen su función mediante la oxidación reversible de dos grupos SH para formar un puente disulfuro. Este sitio activo se encuentra localizado en la segunda lámina beta II. Tanto las Trx como las Grx pueden actuar como intermediarios en diferentes reacciones utilizando electrones provenientes del NADPH. El sistema de las tiorredoxinas se encuentra compuesto por la Trx, la flavoproteína que reduce a la Trx (TrxR) y por el NADPH, mientras que el sistema de las glutarredoxinas esta formado por la Grx, el glutatión, la flavoproteína y el NADPH (Lu y col. 2014a).

Los miembros de la familia de las tiorredoxinas catalizan la reducción reversible de puentes disulfuro mediante el uso de los residuos de Cys presentes en su sitio activo. El residuo Cys N-terminal en el sitio activo presenta un bajo pKa (por debajo del pKa de la Cys libre) y se encuentra expuesto en la superficie de la proteína, mientras que el residuo Cys C-terminal presenta un pKa más alto y no se encuentra expuesto (Fig.4). El mecanismo de acción de estas proteínas requiere de los dos sitios tiol activos y ocurre en varios pasos. En un primer paso, la proteína Trx se une de forma no covalente al disulfuro de la proteína blanco. A continuación, el tiolato de la Cys N-terminal actúa como un nucleófilo y ataca el disulfuro blanco de modo que se forma un intermediario que luego es reducido por el tiolato C-terminal, generando un disulfuro en

la Trx y un ditiol en la proteína blanco. Finalmente, el sitio activo de la Trx es reducido por la TrxR, que obtiene electrones del NADPH, mientras que el sitio activo de una Grx es reducido por dos moléculas de GSH, que a su vez son reducidas por la glutatión reductasa que obtiene sus electrones del NADPH (Lu y col. 2014a; Lu y col. 2014b; Lillig y col. 2007).

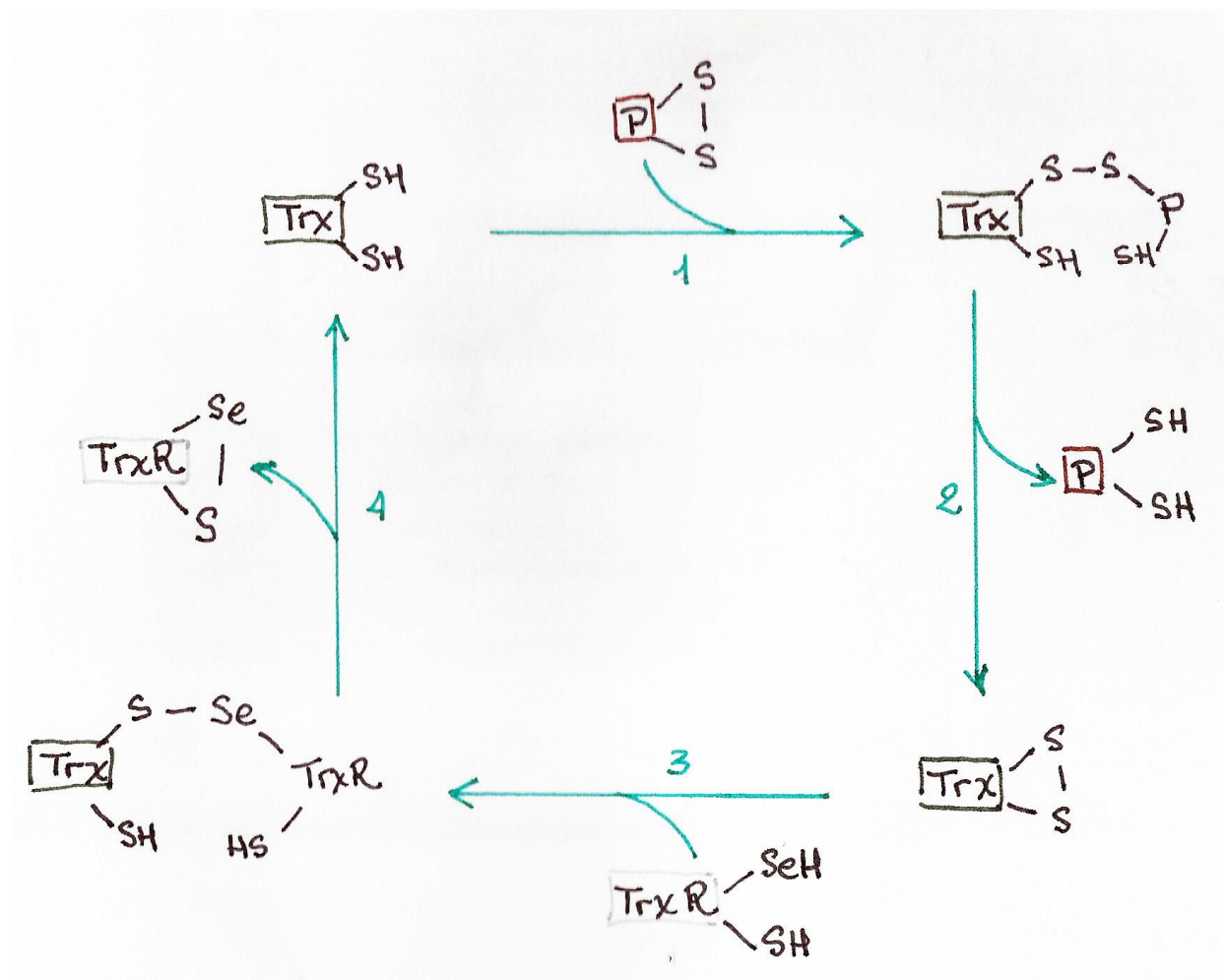


Figura 4: Esquema que resume las reacciones involucradas en el mecanismo de acción de las tioredoxinas.

Dentro de la familia de las tioredoxinas también se encuentran las Prx, clasificadas como Prx típicas (Prx1, Prx2, Prx3 y Prx4) y Prx atípicas (Prx5 (2-Cys Prx))

y Prx6 (1-Cys Prx)). Al igual que las Trx y Grx, las Prx utilizan grupos tiol como reductores. Sin embargo, sus dadores de electrones varían de acuerdo a las subfamilias a las que pertenecen, encontrándose entre ellos el GSH y las mismas Trx. La particularidad de las Prx atípicas es que usan como dadores a Trx (Prx5) y otros aún desconocidos (Prx6) (Hofmann y col. 2002).

Recientemente se ha descrito un mecanismo de acción alternativo, que es exclusivo de las Grx. Este mecanismo requiere la participación del residuo N-terminal que permite a las Grx reducir disulfuros mixtos entre proteínas y GSH, formando un intermediario que consiste en un disulfuro mixto entre la Grx y el GSH que a continuación es reducido por otra molécula de GSH (Lu y col. 2014a, Lillig y col. 2007). Por otro lado, las Nrxx poseen un motivo WCPPC en el dominio Trx. Sin embargo, la secuencia primaria de este dominio no presenta alta homología con la del dominio de las Trx. Más aún, ninguno de los residuos aminoacídicos de las Nrxx se corresponde con ASp26, que en la Trx1 de humanos ayuda a la desprotonación de la Cys catalítica en el sitio activo. El dominio TRX de las Nrxx comparte más porcentaje de similitud con el de la tryparredoxina (TryX) que con la Trx1 (Funato y col. 2007).

2.2 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

En mamíferos se pueden encontrar dos tipos de Trx: Trx1 y Trx2, comprendiendo dos sistemas de tiorredoxinas diferentes: el citosólico (Trx1) y el mitocondrial (Trx2) (Lu y col. 2014a). La Trx1 es una proteína mayoritariamente citosólica, aunque puede ser transportada al núcleo o fuera de la célula frente a diferentes estímulos, mientras que la Trx2 es una proteína esencialmente mitocondrial (Fig. 5). En cuanto a las TrxR,

flavoproteínas que tienen como función la reducción de las Trx, se encontraron tres isoenzimas en mamíferos: Trx1R (citoplasmática), TrxR2 (mitocondrial) y TGR (glutatión reductasa específica de testículo) (Lillig y col. 2007).

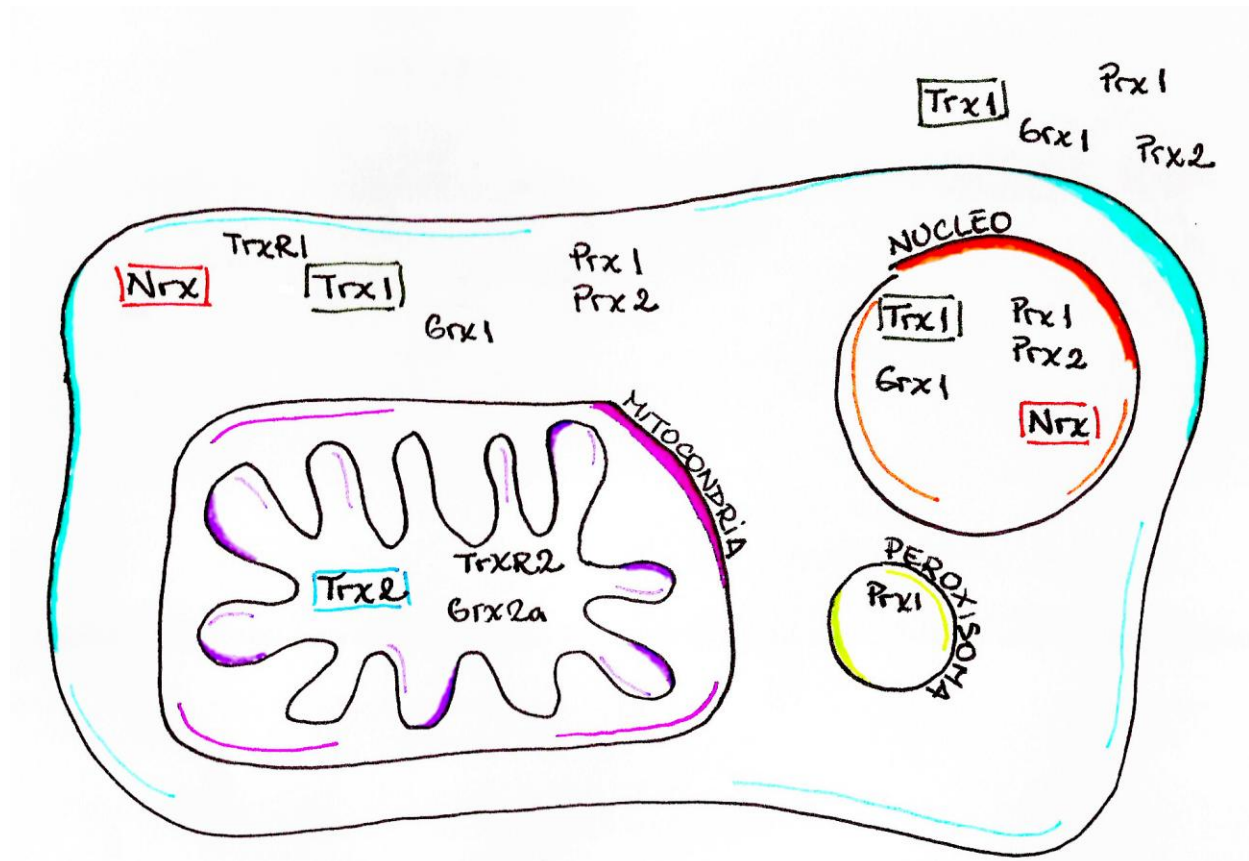


Figura 5: Esquema de localización intracelular de diferentes proteínas de la familia de las Tiorredoxinas.

Kurooka y col. (1997) reportaron que las Nr1 en células COS-7 presentan localización nuclear. Sin embargo, Funato y col. (2007) observaron que las Nr1 en células NIH3T3 localizan principalmente en el citosol. Además, no se ha encontrado una señal de localización nuclear de las Nr1. Una teoría que podría explicar esta discrepancia es que las Nr1 entran al núcleo formando un complejo junto con algunas de sus proteínas blanco, de las cuales Dishevelled (Dvl) posee localización nuclear. Sin

embargo, se requieren más estudios para poder comprender exactamente cual es la naturaleza de la posible movilización de las Nr_x entre el núcleo y el citosol (Funato y col. 2007).

2.3 FUNCIONES EN MAMÍFEROS

Las Trx junto con las Grx mantienen el ambiente celular reducido, por reducción de disulfuros proteicos, mediando así la respuesta celular frente a variaciones del estado *redox*. Las Trx funcionan neutralizando las ROS, además de regular moléculas señal y factores de transcripción.

2.3.1 Transferencia de electrones

Tanto las Trx como las Grx, en *E. coli*, funcionan como reductores del disulfuro necesario para que la ribonucleótido reductasa convierta nucleótidos en desoxinucleótidos, siendo la Grx1 la principal dadora de electrones en *E. coli in vivo*. Las Trx de mamíferos resultaron ser sustratos muy eficientes para la ribonucleótido reductasa en experimentos *in vitro* (Zahedi Avval y col. 2009). La actividad de las Trx como antioxidantes se encuentra íntimamente ligada a la transferencia de electrones de éstas a las Prx, metioninsulfoxido reductasas (Msrs ; del Inglés *Methionine sulfoxide reductases*) y a diferentes factores de transcripción relacionados con el estado *redox* (Lu y col. 2014a).

2.3.2 Apoptosis

La Trx1 en humanos se une a la quinasa reguladora de señalización de apoptosis (ASK1), de modo que las formas reducidas de la Trx1 y la Grx1 forman un complejo con la porción N-terminal de la ASK1, suprimiendo su actividad y promoviendo su ubiquitinización y posterior degradación. Al oxidarse, la Trx1 y la Grx1 se disocian del complejo y se activa la ASK1. La Trx1 y la Grx1 estarían actuando como un sensor *redox* y regulando negativamente la apoptosis (Saitoh y col. 1998, Song y col. 2002, Song y col. 2003, Hanschmann y col. 2013, Wu y col. 2015, Lu y col. 2012). Por otro lado, la Trx1 también cataliza la trans-nitrosilación o denitrosilación de la caspasa-3, regulando de esta forma su actividad proteasa. A su vez, se ha determinado que la Trx2 se encuentra involucrada en la denitrosilación y activación de la procaspasa 3 frente a un evento hipóxico-isquémico (Mitchell y col. 2005, Sun y col. 2013).

2.3.3 Proliferación

Varios miembros de la familia de las tiorredoxinas son capaces de aumentar la proliferación celular y, por lo tanto, se los ha implicado en procesos de tumorigénesis. Esta función ha sido detectada no solo en células cancerígenas sino también en hepatocitos, linfocitos y fibroblastos normales (Lillig y col. 2007). La proteína que se une a la Trx-2 (TBP-2; del Inglés *Trx binding protein 2*; también llamada Txnip) lo hace específicamente a una Trx reducida, regulando negativamente las funciones de la misma. Al aumentar la expresión de TBP-2, ésta inhibe la interacción entre la Trx y la

ASK-1 produciendo una disminución en la proliferación y un incremento de la apoptosis (Hanschmann y col. 2013; Yu y col. 2013). Se ha sugerido que la Grx1 se encuentra involucrada en el control de la proliferación de células epiteliales primarias de la lente de ratones. En células epiteliales de mama humana, una alta expresión de Prx1 correlaciona positivamente con la tasa de proliferación (Lillig y col. 2007).

2.3.4 Diferenciación

La vía de señalización de Wnt (relacionada con la proteína Wnt, del inglés *Wingless-related integration site*) en mamíferos está compuesta por varios ligandos de la proteína Wnt junto con otras moléculas que, en conjunto, juegan un papel esencial en la morfogénesis temprana y el mantenimiento de células madre (Funato y col. 2007). Sin embargo, hasta el día de hoy el mecanismo exacto de la vía de Wnt no ha sido dilucidado. Por ejemplo, se sabe que Dvl es crucial para la transducción de la señal desde el receptor de Wnt, y a su vez se ha observado que la sobreexpresión de Nrxa induce cambios de fosforilación en Dvl, lo cual estaría afectando la activación de la vía de Wnt. De este modo, las Nrxa estarían regulando la actividad de Dvl en esta vía de señalización (Funato y col. 2007).

2.3.5 Regulación de factores de transcripción

Las Trx y Grx actúan sobre la regulación de factores de transcripción en respuesta al estado *redox* celular (Hawkes y col. 2014). Por ejemplo, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB, del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) tiene una subunidad

susceptible a oxidación. Es necesaria la reducción de una cisteína de esta subunidad para que NFκB, luego de disociarse del inhibidor del NFκB (IκB, del inglés *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*) y de traslocar al núcleo, se una a su sitio blanco en el ADN. Se ha demostrado que la Trx1 es la responsable de la reducción de esta Cys en el núcleo (Hawkes y col. 2014). La actividad de varios factores de transcripción relacionados con el estado *redox* se encuentra mediada por las Trx o Grx, entre ellos podemos mencionar a Nrf2, Ref-1, NF-κB, P53, HIF-1α, p53, receptor de glucocorticoides, receptor de estrógenos y otros factores como la familia de complejos proteicos AP-1 (Lu y col. 2014a, Lillig y col. 2007).

3 HIPOXIA-ISQUEMIA

Cuando un organismo es expuesto a una injuria hipóxica-isquémica sus tejidos sufren los efectos provocados por la disminución del flujo sanguíneo, junto con la consecuente reducción de los niveles de oxígeno y glucosa, generándose cambios en la homeostasis de los tejidos. Por lo tanto, el daño isquémico afecta sólo a las células que dependen del metabolismo aeróbico (fosforilación oxidativa), para completar su demanda energética, y no a aquellas que dependen solo de la glicólisis anaeróbica (de Groot y col. 2007; Mergenthaler y col. 2004). Todos los órganos del cuerpo se ven afectados por un evento hipóxico-isquémico, sin embargo, tanto en humanos como en modelos animales se ha demostrado que el sistema nervioso central (SNC) es uno de los más afectados por este evento (de Groot y col. 2007; Kalogeris y col. 2012).

Gracias a un gran número de estudios clínicos y experimentales, llevados a cabo durante las últimas cuatro décadas, el conocimiento de los mecanismos del insulto hipóxico-isquémico se ha incrementado considerablemente (Johnston y col. 2000; Vannucci y col. 1990). La baja cantidad de oxígeno y glucosa que llega al SNC durante un evento hipóxico-isquémico, afecta el metabolismo mitocondrial, dando comienzo a una cascada excito-oxidativa que en última instancia resulta en un daño al SNC (Johnston y col. 2011). Durante el insulto hipóxico-isquémico el metabolismo oxidativo mitocondrial se ve alterado, se produce un descenso del pH celular, un aumento de lactato, modificaciones en la homeostasis celular de diferentes iones, se activan hidrolasas, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, disminuyen los niveles de ATP y se libera glutamato, un importante neurotransmisor excitatorio cuyo exceso puede llevar a la muerte celular por excitotoxicidad (Edwards y col. 2000; Johnston y col. 2011). El pH dentro del citosol disminuye debido a la acción de diversos factores, entre ellos: degradación del ATP, incremento en la glicolisis y, posiblemente, liberación de H^+ provenientes de lisosomas dañados (de Groot y col. 2007). Una disminución de la actividad de la Na^+/K^+ adenosin trifosfatasa (ATPasa), concomitante con un incremento en el intercambio de Ca^{2+} por Na^+ por la acción del antiportador Na^+/Ca^{2+} , sumado a un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a una limitada recaptación de calcio por parte del retículo endoplasmático y a procesos reguladores del pH, son los eventos responsables del incremento de las concentraciones intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} (de Groot y col. 2007 ; Kalogeris y col. 2012; Uria-Avellanal y col. 2014). Estos cambios en la homeostasis iónica llevarían a la activación de hidrolasas y a la disrupción de la membrana plasmática, incluyendo cambios en la

permeabilidad de la membrana mitocondrial, que finalmente llevan a la degradación de ATP (de Groot y col. 2007). Más aún, los altos niveles de Ca^{2+} intracelular generan un aumento de la excitabilidad neuronal (Johnston y col. 2000). Estos cambios celulares llevan eventualmente a la activación de varios receptores postsinápticos, iniciando lo que se conoce como cascada excitotóxica, la cual afecta directamente las funciones mitocondriales. En pocas palabras, la alteración del metabolismo mitocondrial genera variaciones en la síntesis de glutamato, mientras que la falla energética debida a la depleción del ATP resulta en un mal funcionamiento de los recaptadores de glutamato, que en situaciones normales transportan este neurotransmisor desde la sinapsis hacia células de la glía (Johnston y col. 2000). Estos eventos llevan a la activación de los receptores de glutamato, en particular los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA, del inglés *N-methyl-D-aspartate*), que son de gran importancia en relación a la actividad excitatoria. La falla energética también lleva a una disminución en el potencial de membrana de la neurona y, por lo tanto, a una apertura pasiva de los canales NMDA, ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA, del inglés *Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) y kainato (Johnston y col. 2000). Cuando estos canales son excesivamente estimulados, tanto por los altos niveles de glutamato como por la despolarización de la membrana asociada a un evento hipoxico-isquémico, se abren y permiten el pasaje de Ca^{2+} hacia el interior de las neuronas, provocando, en última instancia, la muerte celular (Johnston y col. 2001) (Fig. 6).

Cuando los niveles de O_2 y glucosa retornan a sus valores normales, el metabolismo oxidativo mitocondrial se ve restaurado, al igual que los niveles de pH intracelulares. Sin embargo, durante la etapa de reperfusión ocurren varios eventos que

son potencialmente dañinos para las células. Luego de la reperusión comienzan a formarse radicales libres que generan un desbalance *redox* junto con la consecuente destrucción de la membrana celular, debido a la peroxidación lipídica, así como daño al ADN y a las mitocondrias, que finalmente conducirán a la muerte celular (Edwards y col. 2000; Johnston y col. 2011; Singh y col. 2014).

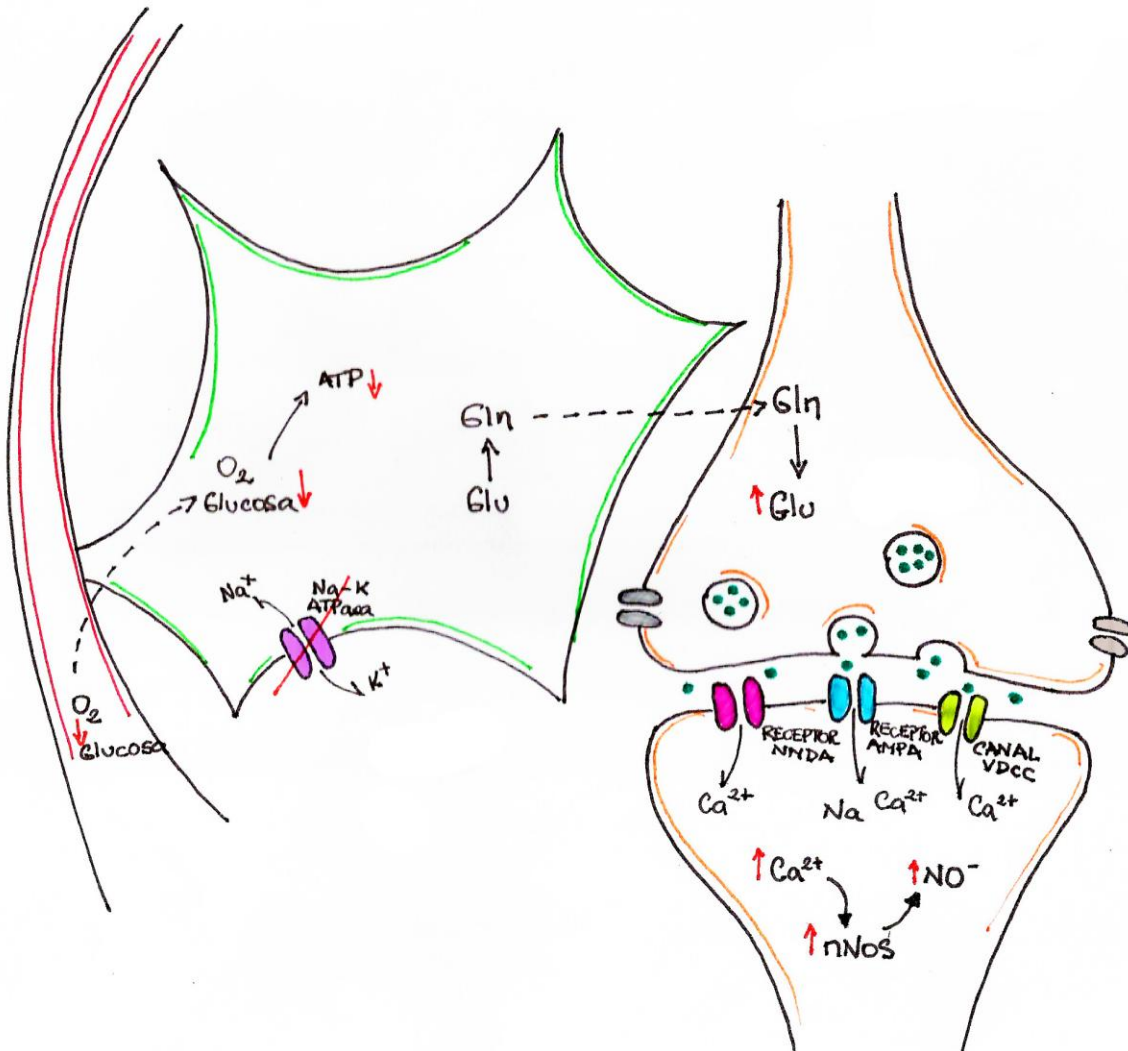


Figura 6: Esquema representativo de los eventos que ocurren frente a una H-I. Al disminuir los niveles de oxígeno y glucosa se genera una disminución de los niveles de ATP y por lo tanto disminuye el funcionamiento de la bomba Na/K ATPasa generando cambios en la polarización de la membrana del astrocito. A su vez aumentan los niveles del neurotransmisor glutamato que activa diferentes canales de Ca en la postsinapsis. Al aumentar los niveles de Ca intracelular se activa la nNOS que genera un aumento de NO , que funciona como un neurotransmisor y a su vez esta involucrado en la forma de especies reactivas.

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que en las neuronas hay un aumento en la producción de NO, conjuntamente con un aumento en la activación de la NOS, tanto durante como luego de la reperusión (Johnston y col. 2000). El daño celular que ocurre durante esta etapa también puede deberse a la acción de restos provenientes de células que han sido dañadas durante la etapa de hipoxia-isquemia, como así también a la activación de células de la microglia (Ferrazzano y col. 2013).

En el SNC, la HI puede ser clasificada de acuerdo a la extensión del daño producido:

La **HI focal** ocurre cuando se ocluye una arteria que es la única responsable de suplir de sangre a una región del cerebro. En este caso, solo este área del cerebro se ve afectada. Sin embargo, dependiendo del grado y la duración de la oclusión, así como de la irrigación colateral a la zona afectada, el tamaño del área afectada puede variar. Esto determina dos zonas características: el *core* y la penumbra. En general, el *core* corresponde a aquella área afectada en la cual no existe irrigación colateral y en la cual la lesión es más severa e irreversible. Por el contrario, la zona de penumbra que rodea el *core*, recibe irrigación desde otras arterias, siendo sus células menos vulnerable a la oclusión, ya que reciben ciertos niveles de O₂ y nutrientes que les permiten recuperarse del daño o, si esto no fuera posible, iniciar una cascada de eventos que terminan en muerte celular programada (Davison y col. 1989).

Se han desarrollado varios modelos animales de HI focal que inducen daño cerebral focalizado, permitiendo investigar la fisiopatología característica de este tipo de injuria. Si bien ninguno de los modelos replica en forma precisa el daño ocurrido, resultan de gran utilidad tanto para el estudio de los mecanismos celulares y

moleculares de la HI, como para la investigación de potenciales agentes terapéuticos.

Entre los modelos existentes podemos mencionar:

- La oclusión permanente o transiente de la arteria cerebral media (ACM). Este modelo consiste en la electrocauterización de la ACM proximal hacia el origen de las arterias del lenticulo estriado lateral (oclusión permanente), o en la ligación de la ACM utilizando suturas o *clips* quirúrgicos (oclusión transiente). Debido a que en humanos el *stroke* es seguido por una reperusión, el modelo de oclusión transiente es el más utilizado cuando se investigan los efectos de la H-I focal en la adultez (Dietrich y col. 1998; Tamura y col. 1981a, Tamura y col. 1981b).
- El modelo no invasivo con suturas intraluminales. Este modelo consiste en la inserción de un filamento de nailon a través de la arteria carótida proximal externa de modo de llegar a ocluir la ACM. La sutura puede retirarse más adelante, lo que permite la recirculación de sangre. Las desventajas de este modelo son que requiere de una gran habilidad quirúrgica y que las áreas infartadas varían mucho entre los sujetos experimentales (Ansari y col. 2011; Dietrich y col. 1998; Rousselet y col.).

La **HI global** es, hasta el día de hoy, la mayor causa de daño cerebral perinatal, siendo la parálisis cerebral, el retraso mental y la epilepsia, sus secuelas más frecuentes (Johnston M. V. y col. 2001; Vannucci y col. 1990b). La encefalopatía como consecuencia de la HI perinatal ocurre en 1-3 de cada 1.000 niños nacidos vivos en el Reino Unido (Uria-Avellanal y col. 2014). De forma similar, el *stroke* afecta a 15 millones de personas alrededor del mundo cada año y es la mayor causa de

discapacidad en los Estados Unidos de América (Wang y col. 2014). A partir de la década de 1970, el conocimiento acerca de la patogenia del insulto hipóxico-isquémico ha aumentado considerablemente (Dietrich y col. 1998), tanto en el aspecto fisiológico como molecular.

La HI global ocurre en casos como el paro cardíaco o la asfixia perinatal (Campanille y col. 2015), en los cuales el flujo de sangre oxigenada hacia todo el SNC se ve interrumpido. Cuando esto ocurre, cada región del SNC y cada tipo celular responden de forma diferente de acuerdo a su vulnerabilidad intrínseca, siendo el neocortex el tejido más afectado y las neuronas el tipo celular más susceptible (Davison y col. 1989).

Entre los modelos animales que se han desarrollado para el estudio de la HI global podemos mencionar los siguientes:

- La oclusión de la arteria carótida común (ACC) combinada con un sistema de hipotensión, hipoxia o anoxia. En este modelo, se pueden obtener diferentes niveles de HI variando el tiempo de exposición a hipotensión, hipoxia o anoxia (Dietrich y col. 1998; Levine y col 1960; Romero y col. 2015). Una de las ventajas de este modelo y sus variaciones es que permite la realización de diferentes estudios, que proveen de valiosa información acerca de los mecanismos que subyacen a la HI, sus efectos en el SNC y posibles terapias.
- El modelo de oclusión de cuatro arterias. En este modelo se utiliza una aguja cauterizadora para electrocoagular las arterias vertebrales mientras que se colocan abrazaderas en las ACCs. El experimentador puede manipular las

abrazaderas a través de una incisión en el cuello del animal, los cuales podrán ser ajustados para producir el insulto, transcurridas 24 h desde la operación (Dietrich y col. 1998; Pulsinelli y col 1982a. Pulsinelli y col. 1982b). Una desventaja de este modelo es que se requieren grandes habilidades quirúrgicas, mientras que una de sus ventajas consiste en que se puede realizar con el animal despierto, permitiendo al organismo reponder ante la injuria sin estar bajo los efectos de la anestesia.

- Otro modelo animal, desarrollado por Bjelke y col. (1991), simula una HI perinatal global y consiste en introducir los cuernos uterinos de una rata preñada a término dentro de un baño termostatzado a 37 °C por 5-20 min. El grado de severidad depende del tiempo en que los cuernos uterinos permanecen sumergidos en el baño térmico (Capani y col. 2001).

Además de modelos animales, también se pueden mencionar algunos modelos de cultivo celular que simulan el insulto hipóxico-isquémico. Entre ellos se encuentran la exposición a diferentes niveles de hipoxia con una posterior reoxigenación, así como la privación de oxígeno y de glucosa (DOG) que es ampliamente utilizada (Newcomb-Fernandez y col. 2001).

4 EL OJO Y LA RETINA

El órgano visual de los vertebrados incluye un sistema dióptrico y diafragma por el que la luz incidente es captada y proyectada hacia la retina. En el ojo adulto podemos encontrar la retina, el cuerpo ciliado y el iris, los cuales se diferencian de

forma directa a partir del neuroepitelio, a pesar de que cada uno exhibe una función diferente (Fig. 7). En muchas especies, la retina no presenta una distribución homogénea, por lo que existen diferencias estructurales entre su sección central y la periférica. El área central de la retina se encuentra organizada de forma tal que se asegura la mayor agudeza visual (Prince, 1956). En la zona central de la retina se encuentra una mayor cantidad de conos (células especializadas en la recepción del estímulo lumínico a través de la acción de las conopsinas) y en muchas especies se observa una depresión llamada fovea en la cual no se encuentran bastones (células especializadas en la recepción del estímulo lumínico a través de la acción de las rodopsinas). Incluso en ratones, que no presentan estas características, las células

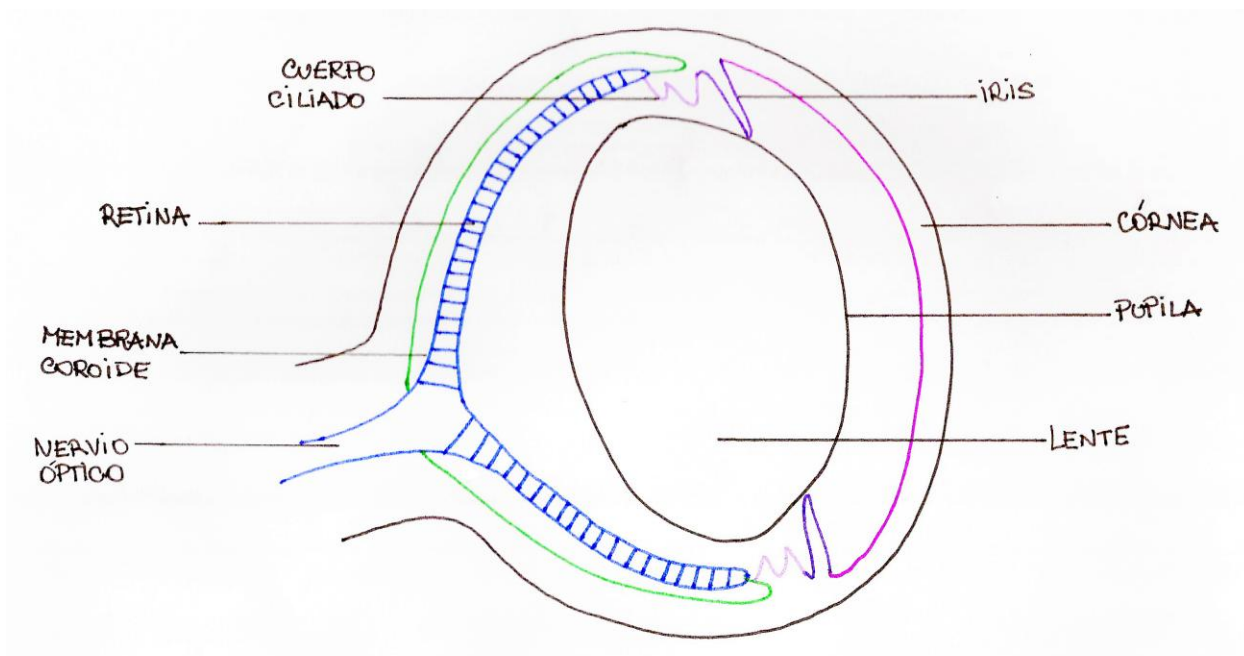


Figura 7: Esquema de la estructura del ojo murino.

ganglionares presentan una organización particular en la retina central (Della Santina y col. 2013).

4.1 RETINA: TIPOS CELULARES

4.1.1 Fotorreceptores

Las retinas de mamíferos presentan entre dos o tres tipos de conos y un solo tipo de bastón. Los conos son estructuras robustas de forma cónica que tienen su cuerpo celular situado en la membrana limitante externa y los segmentos internos y externos que protruyen hacia el epitelio pigmentario retiniano (EPR). En la fovea, donde se concentran los conos, los cuerpos celulares se ubican en columnas oblicuas debajo de la membrana limitante externa. Los bastones, por otro lado, presentan forma alargada y sus segmentos internos y externos rellenan el área que dejan los conos en el espacio subretinal, llegando a las células del epitelio pigmentario. Los cuerpos celulares de los bastones se encuentran debajo de los cuerpos celulares de los conos y forman parte de la capa nuclear externa (Ebrey y col. 2001) (Fig. 8).

4.1.2 Células ganglionares

Este tipo de neurona se caracteriza por presentar un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de la capa plexiforme interna con las terminaciones de células bipolares y amacrinas. El axón se sitúa a nivel de las fibras del nervio óptico y solo se mieliniza a este nivel, fuera del globo ocular. Este axón llega hasta el cuerpo geniculado externo, donde ocurre la sinapsis de la vía visual.

En la retina humana se pueden encontrar tres tipos morfológicos de células ganglionares, las denominadas difusas grandes, difusas pequeñas y enanas. Otros autores simplifican esta clasificación distinguiendo sólo ganglionares pequeñas o

"células de tipo P", que proyectan hacia las capas parvo celulares del cuerpo geniculado lateral, y ganglionares grandes o "células de tipo M", que proyectan hacia las capas magno celulares del cuerpo geniculado lateral. En esta clasificación, las ganglionares de tipo P incluyen a las ganglionares enanas y a las difusas pequeñas (Shapley y col. 1986; Rodieck y col. 1988; Dacey y col. 1992) (Fig. 8).

4.1.3 Células bipolares

Presentan un cuerpo celular situado en la capa nuclear interna, desde donde parten dendritas que se dirigen hacia la capa plexiforme externa, lugar en que contactan con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores. El axón termina a nivel de la capa plexiforme interna, en donde hace sinapsis con las células ganglionares (Kolb y col. 1992) (Fig. 8). En la retina humana se han descrito nueve tipos morfológicos de células bipolares (Wässle y col. 2004, Kolb y col. 1992; Mariani y col. 1984). Ocho de estos tipos celulares corresponden a células bipolares para conos, mientras que solo existe un tipo de célula bipolar para bastones.

4.1.4 Células horizontales

Una característica en común de las retinas de mamíferos, es que todas contienen células de asociación lateral a nivel de la capa plexiforme externa, llamadas células horizontales. Estudios que combinan microscopía óptica y electrónica con el método de Golgi demostraron que en la retina humana existen tres tipos de células horizontales (Kolb y col. 1994), a saber: 1) las células horizontales de Tipo I, que no poseen axón y contactan preferentemente con conos rojos y verdes; 2) las células

horizontales de Tipo II (células horizontales con axón), que contactan con conos azules a nivel del axón terminal y con los otros tipos de conos a nivel de sus terminaciones dendríticas (Fig. 8); 3) las células horizontales de Tipo III, que son semejantes a las células de Tipo I, aunque de mayor tamaño (Ahnelt y col. 1994).

Los fotorreceptores liberan glutamato cuando se encuentran en condiciones de oscuridad, permaneciendo despolarizados. Cuando llega la estimulación luminosa los fotorreceptores se hiperpolarizan, cesando la liberación de neurotransmisores y despolarizándose o hiperpolarizándose las células bipolares según los receptores postsinápticos que posean. Las células horizontales también responden a la luz con una hiperpolarización, existiendo sinapsis recíprocas desde las células horizontales hacia los fotorreceptores. Estas sinapsis hacen que la información de las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos, realicen una sumación espacial de los estímulos, colaborando en la organización centro/periferia de los campos receptores de las células ganglionares. De esta manera, se establece un circuito local a nivel de las terminaciones de los fotorreceptores y las células horizontales, las que influyen el flujo de información a lo largo de toda la retina (Feigenspan y col. 2015).

4.1.5 Células amácrinas

Las células amácrinas fueron descritas por primera vez por Dogiel (1891) quien no pudo descubrir en ellas un verdadero axón, aunque fueron los estudios de Ramón y Cajal (1892) los que permitieron precisar mejor su morfología, distribución y tipos

celulares. Su cuerpo celular se encuentra ubicado en la capa nuclear interna, desde la cual se extienden prolongaciones hacia la capa plexiforme interna (Uchiyama y col. 2005) (Fig. 8). Estas células reciben conexiones de células bipolares y de otras células amácrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y bipolares (Fig. 8). De este modo, forman la vía de asociación lateral a nivel de la capa plexiforme interna (Vuong y col. 2015). Algunos tipos de células amácrinas presentan largos procesos celulares que pueden actuar como verdaderos axones. Sin embargo, estos procesos permanecen siempre dentro de la retina y no salen por el nervio óptico, como sucede con los axones de las células ganglionares (Kolb y col. 2005).

4.1.6 Células del epitelio pigmentario retiniano

El EPR de la pared externa de la vesicular óptica se encuentra conformado por células de estructura cúbica o con forma de adoquín (Fig. 8). La superficie apical se encuentra en contacto con una matriz extracelular, que a su vez contacta con la capa de fotorreceptores y con los segmentos externos de estos últimos, mientras que la capa basal limita con la membrana de Bruch. Estas células se encuentran altamente polarizadas, permitiendo el correcto transporte de nutrientes y O_2 , hacia y desde la retina neural (Bonilha y col. 2014).

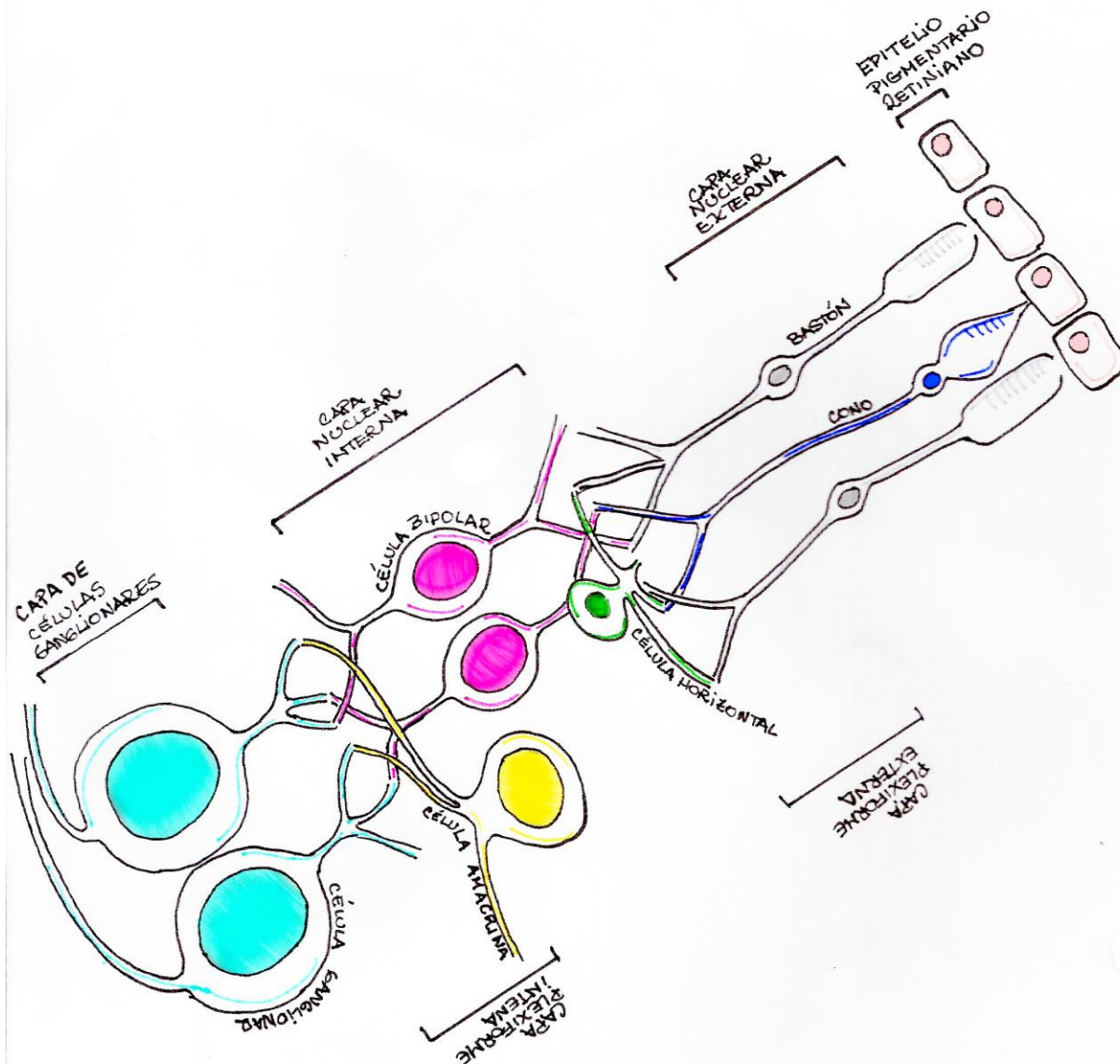


Figura 8: Esquema representativo de la organización de las células en la retina de mamíferos. La capa de células ganglionares (CGL) se encuentra compuesta por los cuerpos de dichas células (celeste). La capa plexiforme interna (CPI) se encuentra compuesta por las prolongaciones de células ganglionares (celeste), bipolares (rosa) y amácrinas (amarillo). La capa nuclear interna (CNI) se encuentra compuesta por los cuerpos celulares de células bipolares (rosa), amácrinas (amarillo) y horizontales (verde). La capa plexiforme externa (CPE) se encuentra compuesta por las prolongaciones de las células bipolares (rosa), horizontales (verde) y de los conos y bastones (azul y gris respectivamente) .

5 TIORREDOXINAS EN TEJIDO RETINIANO

Los órganos de los sentidos se encuentran sometidos a varias fuentes de ROS (Lillig y col. 2007). El daño provocado por la HI es el común denominador de distintas enfermedades de la retina, como ser la retinopatía del prematuro y el glaucoma agudo. Distintos estudios han demostrado la presencia de inflamación, activación astrocitaria y neurodegeneración en la retina expuesta a un insulto isquémico (Yokota y col. 2011). La muerte neuronal que ocurre en la retina debida a la HI seguida por una reperusión, es la mayor causa de problemas visuales y ceguera (Wang y col. 2015). Como se ha mencionado con anterioridad, el evento hipóxico/isquémico seguido de una reperusión/reoxigenación trae aparejadas modificaciones en el estado *redox* celular. Es en este punto en el que las Trxs juegan un papel crucial que ha sido objeto de diferentes estudios, en distintos modelos y enfermedades.

5.1 TIORREDOXINAS EN EL OJO Y LA RETINA

Se ha detectado la presencia de Trx1 en la lente del ojo y retina de ratones a partir del día embrionario 13 (E13). La Trx1 y su reductasa, la TrxR1, también han sido observadas en retinas de ratas en desarrollo (Hansson y col. 1989).

El EPR es responsable de proveer a los fotorreceptores de nutrientes y se encuentra involucrado en la formación de la barrera hemato-retiniana (Dunn y col. 1996). En estudios realizados en ratón, se han encontrado varias proteínas de la familia de las Trx en este epitelio (Lillig y col. 2007, Godoy y col. 2011).

En trabajos realizados en diferentes modelos de patologías asociadas a la retina se han observado modificaciones en la expresión de distintas Trxs. Por ejemplo, en un modelo de cataratas en ratones, sometidos a estrés oxidativo inducido por fotoquímica, se encontró un aumento en la expresión y actividad de la Trx1 en el cristalino (Reddy y col. 1999). Por otro lado, se ha encontrado una disminución de la expresión de Trx1 en un modelo de glaucoma generado por presión intraocular elevada (PIE) en ratas. Tanto en este último estudio, como en un modelo que utiliza la administración de NMDA con el fin de producir isquemia y glaucoma, se han observado altos niveles de la Proteína que Interactúa con TRX (Txnip; del inglés *Thioredoxin-interacting protein*) (Munemasa y col. 2010). Se ha propuesto que esta proteína es un antagonista de Trx1 y que podría estar involucrada en los procesos de inflamación y apoptosis debidos a isquemia (Al-Gayyar y col. 2011).

Por otro lado, en pacientes con retinopatía diabética, se observó un aumento de Prx1 en el humor vítreo (Gao y col. 2008). Asimismo, se observó una inducción de la expresión de Prx3 al tratar con H₂O₂ a células del cristalino provenientes de humanos y ratones (Lee y col. 2007).

6 TRATAMIENTOS CON TIORREDOXINAS

Varios estudios han demostrado que los niveles de Trx1 aumentan luego de una HI cerebral (Koh y col. 2010, Romero y col. 2015), sugiriendo que la Trx1 cumple un papel importante en esta injuria. Se demostró que la sobreexpresión de Trx1 en

modelos de isquemia focal, tanto permanente como transiente, genera una disminución de la apoptosis (Takagi y col. 1999; Zhou y col. 2009).

6.1 TRATAMIENTOS CON TIOREDOXINAS EN RETINA

Algunos estudios encontraron que tanto la sobreexpresión de Trx1 en ratones, como la administración intravítrea de Trx1 humana recombinante, suprime la reducción de fotorreceptores y la apoptosis consecuencia de la exposición de la retina a altos y prolongados niveles lumínicos (Kong y col. 2010; Tanito y col. 2002). La inyección intravenosa de Trx1 en ratones que fueron expuestos a una isquemia focal transiente, disminuyó el área del infarto y generó una disminución de los déficits neurológicos (Hattori y col. 2004). Se ha demostrado que altos niveles de Trx1, Grx1, Grx2 y Prx2, obtenidos tanto por sobreexpresión como por administración externa, son capaces de atenuar el daño isquémico inducido en neuronas (Boulos y col. 2007; Takagi y col. 1999; Zhou y col. 2009). Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de Trx1 genera una disminución de la muerte celular en un modelo de glaucoma (Munemasa y col. 2009), así como la inyección intravítrea de Trx1 atenúa el daño producido por la administración de NMDA en el modelo de isquemia y glaucoma (Inomata y col. 2006). Por otro lado, se ha podido observar que la sobreexpresión de Trx2 en la retina y el nervio óptico atenúa la degeneración causada por PIE (Munemasa y col. 2009, Munemasa y col. 2010).

“The game of science is, in principle, without end. He who decides one day that scientific statements do not call for any further test, and that they can be regarded as finally verified, retires from the game.”

Karl Popper

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS

La HI genera cambios, no solo en la morfología del tejido retiniano, sino también en su composición celular y en la expresión de dos proteínas de extrema importancia para la correcta regulación redox de las células: Trx1 y Nrj.

1. La HI genera cambios en la morfología del tejido retiniano
2. La HI altera la composición celular del tejido retiniano
3. La HI provoca cambios en la expresión de dos proteínas que participan en la regulación redox de las células, la Trx1 y la Nrj

Estos cambios están ligados entre sí ya que estas redoxinas se encuentran involucradas en eventos de viabilidad/proliferación y diferenciación en células del epitelio pigmentario retiniano.

2 OBJETIVOS

- Evaluar el daño provocado por la HI sobre el tejido retiniano en dos modelos de HI perinatal.
- Evaluar los cambios en la expresión de Trx1 y Nrj que ocurren en retinas de animales jóvenes previamente expuestos a HI.
- Determinar como la hipoxia y la posterior reoxigenación afecta la viabilidad/proliferación, la morfología y la expresión de marcadores neuronales y gliales

de diferenciación, en células del epitelio pigmentario retiniano, utilizando como modelo una línea celular de dicho tejido.

- Evaluar cómo la hipoxia y la reoxigenación modifican la expresión de Trx y Nr1 en células del epitelio pigmentario retiniano.
- Determinar cómo el silenciamiento de Trx1 o de Nr1 afecta la viabilidad/proliferación, morfología y la expresión de distintos marcadores de diferenciación neuronal y glial en células del epitelio pigmentario retiniano.
- Evaluar el efecto que tiene la administración de Trx1 en retinas de animales expuestos a HI perinatal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

1.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los experimentos pertenecientes al presente trabajo de tesis fueron realizados de acuerdo a los principios de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publications No. 80-23, revisado 2011), y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, resolución N°2238/2010) de la Universidad de Buenos Aires (Facultad de Medicina). En cada experimento se hizo lo posible para reducir el número de animales a utilizar y minimizar su sufrimiento.

1.2 ANIMALES

Para todos los experimentos realizados en el presente trabajo se utilizaron Ratas preñadas de la cepa Sprague-Dawley (especie *Rattus norvegicus*) fueron obtenidas en el bioterio central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Dichos animales fueron transportados al Instituto de Investigaciones Cardiológicas “Prof. Dr. Alberto C. Taquini” (ININCA), dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y del CONICET, una semana previa a la fecha estimada de parto.

1.3 ALOJAMIENTO

Todos los animales utilizados en el presente trabajo de tesis fueron alojados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Cardiológicas “Prof. Dr. Alberto C. Taquini” (ININCA) en condiciones estándares, mantenidos en un ambiente con control de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad ($65 \pm 5\%$) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con acceso libre a comida y agua.

1.4 MODELOS DE HIPOXIA/ISQUEMIA -REOXIGENACIÓN

1.4.1 Modelo de hipoxia-reoxigenación en células ARPE-19

Se ha utilizado una línea celular espontánea proveniente del epitelio pigmentario de la retina de un paciente de 19 años denominada ARPE-19. Las células fueron descongeladas y mantenidas en frascos de cultivo conteniendo un medio de cultivo preparado con 50% del medio Ham y 50% de DMEM, adicionados con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml. Los frascos de cultivo se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera con una humedad del 90%, 20% de O₂ y 5% de CO₂. Con el fin de producir la hipoxia y posterior reoxigenación, las células pertenecientes a un frasco fueron divididas en tres, estos frascos de cultivo fueron introducidos en una cámara bajo condiciones de 90% de humedad, 1% de O₂ y 5% de CO₂ durante 24 h. Pasadas las 24h aquellos frascos expuestos a reoxigenación fueron devueltos a un ambiente con 20% de O₂. El frasco correspondiente al control normóxico fue colocado nuevamente en un ambiente con 20% de O₂ y 5% de CO₂ (Fig. 9).

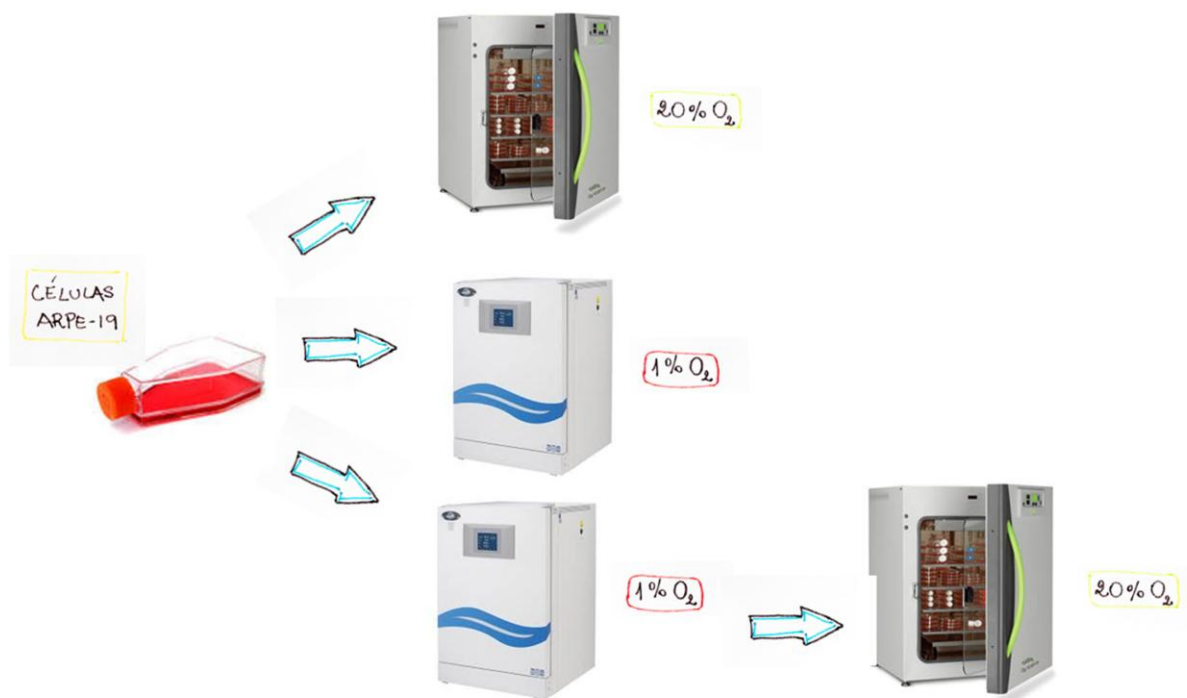


Figura 9: Esquema del modelo experimental utilizado con el fin de estudiar los efectos de la hipoxia-reoxigenación utilizando la línea celular ARPE-19. Las células fueron descongeladas y mantenidas en frascos cultivo conteniendo un medio de cultivo. Los frascos de cultivo se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera con una humedad del 90%, 20% de O₂ y 5% de CO₂. Con el fin de producir la hipoxia y posterior reoxigenación, los frascos de cultivo fueron introducidos en una cámara bajo condiciones de 90% de humedad, 1% de O₂ y 5% de CO₂ durante 24 hs. Pasadas las 24hs aquellos frascos expuestos a reoxigenación fueron devueltos a un ambiente con 20% O₂. El frasco correspondiente al control devuelto a un ambiente con 20% de O₂ y 5% de CO₂.

1.4.2 Modelo de asfixia perinatal

Con el fin de desarrollar el modelo de asfixia perinatal se utilizaron 12 ratas preñadas en el día 22 de gestación. Los animales fueron anestesiados y decapitados rápidamente, luego de lo cual se procedió a extraer los cuernos uterinos mediante una incisión abdominal. A continuación, los cuernos uterinos fueron colocados en un baño térmico a 37 °C durante 19 min (AP subsevera) (Bjelke y col. 1991, Van de Berg y col. 2002, Capani y col. 2009). Al finalizar el tiempo de asfixia se extrajeron los cuernos

uterinos del baño térmico, se depositaron sobre una manta térmica debidamente preparada y se abrieron los mismos con rapidez, de modo de sacar las crías lo más rápido posible para terminar con la asfixia. Se limpió el líquido amniótico de las crías con papel estéril y las mismas fueron estimuladas para que comiencen a respirar con golpes leves e intermitentes, sobre la caja torácica, durante unos minutos hasta observar que respiraran con regularidad.

Por último, se ligó el cordón umbilical con hilo estéril y se dejó que los animales se recuperen durante 1 h bajo una lámpara calorífica de modo que su condición sea óptima al momento de ser colocados con las madres sustitutas. Las crías expuestas al evento hipóxico-isquémico (grupo AP) fueron marcadas y se dispusieron en grupos



Figura 10: Esquema del modelo de asfixia perinatal (AP) utilizado con el fin de estudiar las consecuencias de la H-I en retinas de ratas Sprague Dawley.

diferentes junto con animales controles que no pasaron por el proceso de asfixia, manteniendo grupos de no más de 10 crías por madre. Los controles (grupo CTL) de este modelo de asfixia fueron obtenidos por parto vaginal (Fig. 10)*.

*En trabajos previos realizados por el laboratorio se ha determinado que no se encuentran diferencias significativas con respecto a pérdida neuronal y astrogliosis entre controles vaginales y controles cesárea en distintas áreas del SNC. Es por esto que en el presente trabajo se han utilizado controles vaginales ya que permite obtener animales CTL y AP de la misma camada (Blanco y col. 2015) .

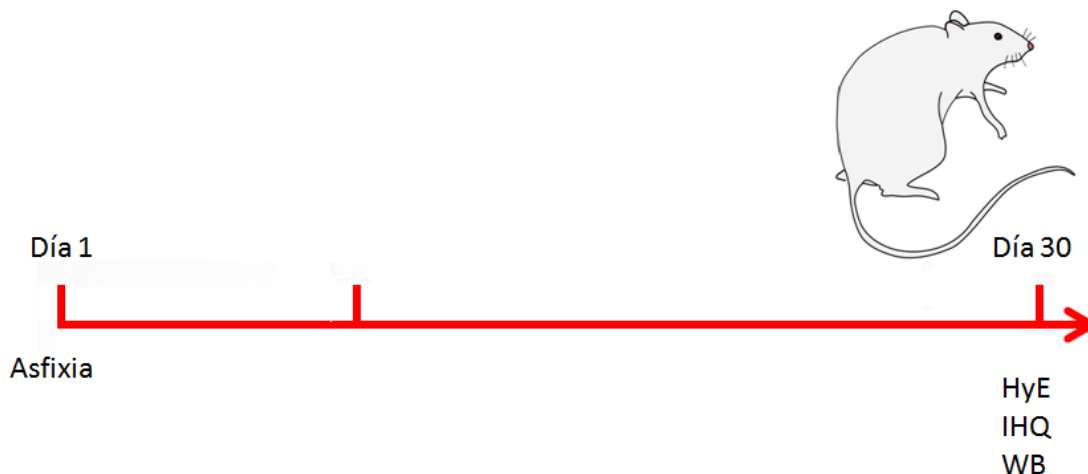


Figura 11: Esquema representando la línea de tiempo a partir la realización de la asfixia y la obtención de los tejidos para Western blot, Inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina.

1.4.3 Modelo de ligación de arteria carótida

El modelo de ligación de la arteria carótida común utilizado en este trabajo, fue previamente desarrollado y validado con distintas variantes por distintos grupos de investigación (Vannucci y col. 2005, López-Aguilera y col. 2012, Romero y col. 2015; Rice y col. 1981). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley preñadas, a partir de las cuales se obtuvieron crías macho. Ha sido de gran importancia observar con detenimiento el día en que nacen las crías con el fin de realizar la cirugía el día correcto. A continuación ratas de 7 d de edad (P7) fueron anestesiadas con una combinación de ketamina 40 mg/kg y xilacina 4 mg/kg.



Figura 12: Esquema del modelo de ligadura de arteria carótida común (ACC) utilizado con el fin de estudiar las consecuencias de la H-I en retinas de ratas Sprague Dawley.

Los animales fueron posteriormente colocados en una placa térmica para asegurar una temperatura corporal constante de 37 °C y se realizó una incisión en la porción derecha del cuello exponiendo la arteria carótida común (ACC), que fue aislada del nervio y tejido circundante y ligada de manera permanente con un hilo quirúrgico 6-0 (Fig. 12). Seguidamente, la herida fue suturada y los animales fueron retornados con sus respectivas madres por un periodo de recuperación de 4h, con el fin de que los efectos de la anestesia hayan desaparecido.

Subsecuentemente, las crías fueron colocadas en un contenedor sellado de vidrio, sumergido en un baño termoestabilizado a 37 °C y expuestas a un ambiente de N₂ al 100% (administrado a una razón de 3 l/min) por un período de 3 min con el fin de inducir una anoxia (grupo CAR). Al finalizar el procedimiento, los animales fueron recuperados mediante masaje cardíaco y maniobras de ventilación, para ser luego retornados a las jaulas con sus respectivas madres, hasta el momento de ser sacrificados para los distintos procesos experimentales. Para los controles experimentales (grupo SHAM), los animales fueron anestesiados y la ACC fue expuesta pero no ligada, y los animales no fueron expuestos a N₂.

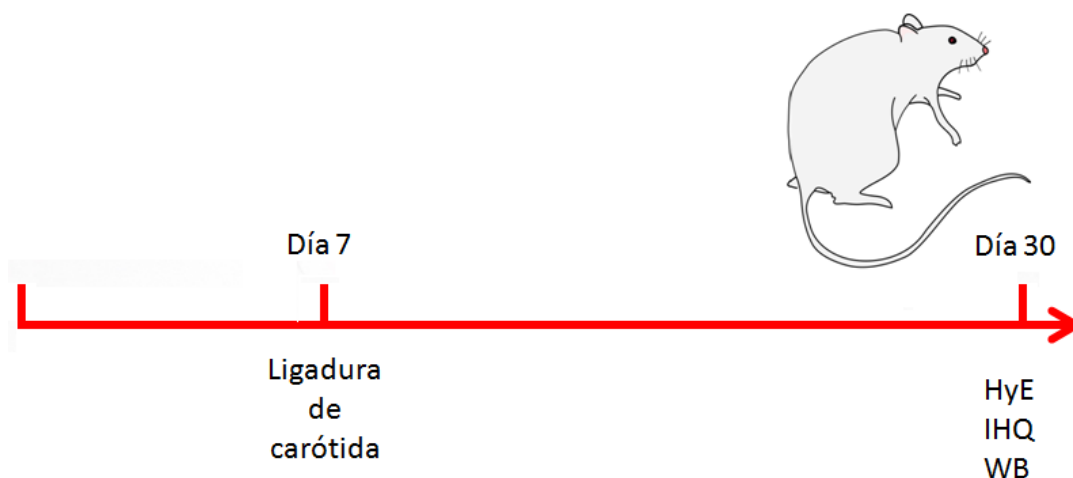


Figura 13: Esquema representando la línea de tiempo a partir la realización de la cirugía y la obtención de tejidos para Western blot, Inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina.

2 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE MODELOS ANIMALES

2.1 HEMATOXILINA-EOSINA

A los tiempos correspondientes, los animales fueron anestesiados utilizando una solución de hidrato de cloral al 28% p/v (i.p., 0,1 ml/ 100 g de peso corporal), y sometidos a una perfusión intracardiaca con una solución fría de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparada en el momento, utilizando *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4). Una vez finalizada la perfusión se extrajo el ojo, que fue post-fijado por 2 h en la misma solución de paraformaldehído al 4%. El tejido fue luego deshidratado utilizando soluciones de alcohol de concentraciones crecientes (70%, 90% y 100%) y xileno. A continuación la muestra fue incluida en parafina, a partir de la cual se obtuvieron secciones sagitales de 8 μ m de espesor que fueron cortadas en un micrótopo para estudios histológicos. En primer lugar, los cortes fueron sometidos un

proceso de hidratación pasando etanol en concentraciones decrecientes para luego ser tratados con hematoxilina por 30 s. Una vez transcurrido este tiempo se lavó el compuesto por 10 min bajo agua corriente, hasta que se observó que el tejido tomó un color violeta/azul característico de la tinción nuclear con hematoxilina. A continuación se trató la muestra con eosina al 0,2 % por 1 min y se lavó en etanol 70% por 15 min. Una vez finalizadas las tinciones, los cortes fueron deshidratados y se procedió a cubrirlos con cubre-objetos utilizando bálsamo de Canadá como medio de montaje. Las secciones fueron examinadas al microscopio y las imágenes fueron capturadas mediante una cámara de video CCD (Canon). Todas las muestras fueron procesadas al mismo tiempo y usando los mismos reactivos. Las imágenes fueron analizadas y compiladas con el programa Adobe Photoshop 11.0 CS4 (Fig.11 y 13).

2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EN TEJIDO RETINIANO

Como se explica en la sección anterior, los animales fueron anestesiados utilizando una solución de hidrato de cloral 28% p/v (i.p., 0,1 ml/ 100 g de peso corporal), y sometidos a una perfusión intracardiaca con una solución fría de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparada en el momento, en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se extrajo el ojo para ser post-fijado en la misma solución de paraformaldehído e incluido en parafina. Se obtuvieron secciones sagitales de 8 μ m de espesor que fueron montadas sobre un portaobjetos de vidrio cargado. Antes de comenzar con la inmunotinción los cortes fueron sometidos aun proceso de hidratación pasando por etanol en concentraciones decrecientes. En primer lugar, las secciones fueron incubadas en una solución de H₂O₂ al 3% por 30 min

a temperatura ambiente con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. Luego de 3 lavados de 10 min con PBS, las secciones fueron incubadas por 20 min en una solución de *buffer* citrato (pH 6,0) a temperatura ambiente, como recuperación antigénica. Las muestras fueron incubadas por 1 h en una solución de suero normal de cabra al 10% (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA) en PBS, con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, para luego ser incubadas con el anticuerpo primario en sus diluciones correspondientes, realizadas en solución de bloqueo (Tabla 2), toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS y subsecuentemente incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado, diluido en solución de bloqueo, (1:500, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) por 2 h a temperatura ambiente. Como sistema de detección se utilizó la Extravidina-Peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secciones fueron incubadas con el sustrato Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 5 min a temperatura ambiente y la reacción fue terminada utilizando agua destilada. Las muestras fueron nuevamente deshidratadas utilizando concentraciones crecientes de alcohol y xilol y cubiertas con cubre-objetos utilizando Bálsamo de Canadá (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las secciones fueron examinadas al microscopio y las imágenes fueron capturadas mediante una cámara de video CCD (Canon). Para cada marcador y grupo todas las muestras fueron procesadas al mismo tiempo, usando los mismos reactivos, las mismas diluciones de anticuerpos y el mismo tiempo de revelado con DAB. Las imágenes fueron analizadas y compiladas con el programa Adobe Photoshop 11.0 CS4 (Fig.11 y 13).

2.2.1 Cuantificación de número de células

Se examinaron cinco secciones adquiridas de un grupo de 4-5 animales. En cada sección se cuantificó el número de células inmunopositivas. Se determinó el número de células marcadas por área, utilizando la herramienta de Image J, “Cell Counter”. Se diagramaron áreas cuadradas de $0,08 \text{ mm}^2$ distribuidas de forma que toda la sección de la retina estudiada se encuentre representada. Se determinó el número de células de forma manual y se calculó el número de células por cada mm^2 .

2.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA

2.3.1 Disección de la retina

Luego de que los animales fueron sacrificados a los 30 días de edad (Fig. 11, 13 y 14), el ojo fue removido y colocado en una placa metálica sobre hielo. A continuación se procedió a extraer la córnea, la lente y el humor vítreo, dejando solo la retina, la esclera y la membrana coroidea (Fig. 7).

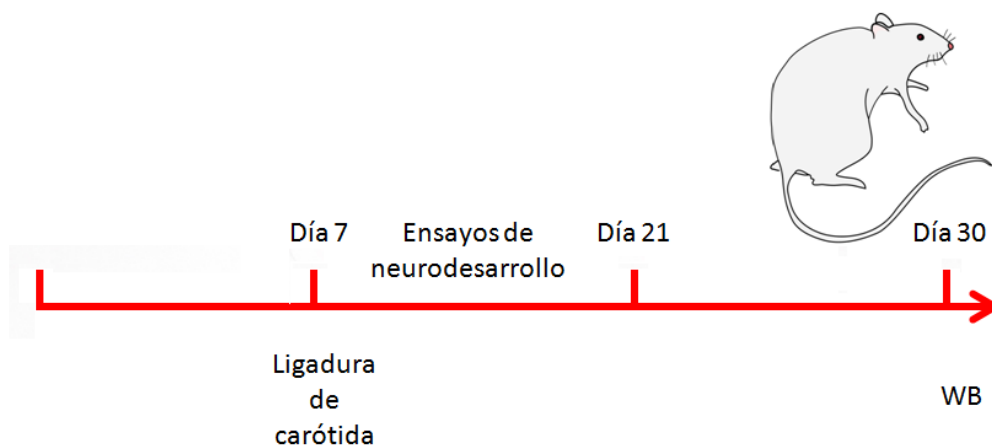


Figura 14: Esquema representando la línea de tiempo a partir la realización de la cirugía y la obtención de tejidos para Western blot.

2.3.2 Extracción proteica

Las muestras fueron homogenizadas mecánicamente en un *buffer* de homogenización (10 mM Tris/HCl (pH 7,4), NaCl 10 mM MgCl 3 mM, EDTA 3 mM NP-40 0,1% con la adición de inhibidores de proteasas (cOmplete, EDTA-free - Roche Applied Science). A continuación, las muestras fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para ser luego descongeladas en hielo y centrifugadas a 21.000 x g por 20 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y éste fue analizado con el fin de determinar la concentración proteica total por el método de Bradford, en una placa de 96 pocillos, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Con el fin de poder realizar una cuantificación precisa se realizó la curva de calibración por triplicado. Las muestras se sembraron por cuatuplicado y como diluciones independientes.

2.4 WESTERN BLOT (WT) DE RETINAS

Una vez cuantificadas las muestras, se tomaron 50 µg de proteínas totales para cada muestra y se diluyeron en *buffer* de siembra (4X: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)); glicerol 50%, SDS 5%, azul de Bromofenol 0,1%) en un volumen final de 20 µl. A continuación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), para lo cual fueron sembradas en un gel de 14% de Acrilamida-Bisacrilamida (AB) con el fin de observar proteínas de la familia de las TRX o en geles de 9% para el análisis de proteínas de mayor tamaño. Las bandas proteicas obtenidas fueron transferidas a membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF, Schleicher &

Schuell, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar con el bloqueo la cantidad total de proteína presente en cada calle de la membrana fue revelado utilizando un equipo de detección de imágenes (ChemiDoc™ MP System) (Fig. 15).

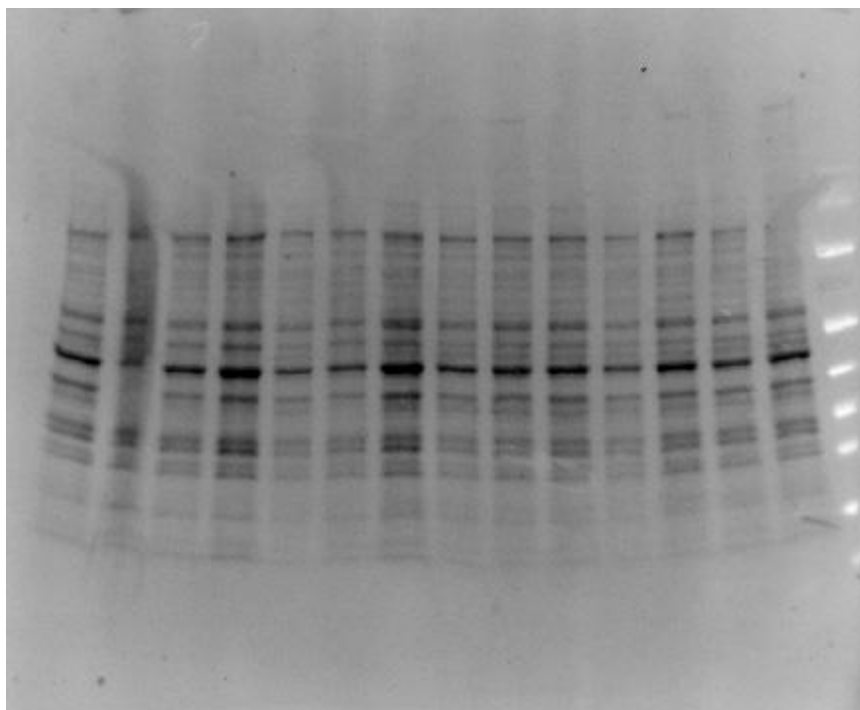


Figura 15: Membrana de PVDF en la cual se pueden observar las proteínas totales reveladas utilizando el Chemidoc.

Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo descremada y BSA 1% en *buffer* Tris salino (1,5M; pH8,8) conteniendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) por 1 h, para ser luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo, toda

la noche a 4°C en agitación (Tabla 1). El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) (1:5000, anti-conejo o anti-ratón, dependiendo del anticuerpo primario utilizado) (Bio-Rad, Richmond CA, EE.UU.) y el sistema de quimioluminiscencia por Luminol (ECL, Amersham). La intensidad lumínica en cada banda fue grabada por medio de un sistema de detección de imágenes (ChemiDoc™ MP System). En todos los experimentos y para cada punto

temporal y/o tratamiento utilizado, cada grupo experimental ($n \geq 5$) fue comparado con su propio grupo control ($n \geq 5$).

3 TRATAMIENTO CON TIORREDOXINAS Y PRUEBAS DE NEURODESARROLLO

3.1 TRATAMIENTO CON TIORREDOXINAS

Luego de transcurrida 1 h de la exposición a N_2I (modelo de ligación de carótida) se administró, intraperitonealmente a los animales, solución salina (grupo vehículo (Vhi)) o 10mg/kg de Trx1 humana recombinante purificada (grupo tratado) (Fig. 14).

3.2 EVALUACION DE NEURODESARROLLO

Los estudios de neurodesarrollo se llevaron a cabo a partir del día siguiente a la inducción de la hipoxia/isquemia (P8) hasta el día en que fueron destetados (P21). Cada animal fue evaluado todos los días a la misma hora (10 am) y por el mismo operador. Con el fin de evaluar los efectos del tratamiento con Trx1 en los animales, estos fueron sujetos a dos pruebas diferentes relacionadas con el desarrollo ocular. Con el propósito de evaluar en qué día ocurre la apertura de los ojos (desarrollo neuromuscular), se examinaron los mismos con extremo cuidado, de modo de verificar si los párpados se encontraban separados. Por otro lado se examinó la aparición del reflejo ocular de parpadeo (desarrollo neurológico) tocando suavemente los párpados con un hisopo (Kiss y col. 2008). Se anotó el día en que cada animal presentaba el reflejo por primera vez así como el día en que los párpados se separaban (apertura de ojos) (Fig. 14).

4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE CULTIVO CELULAR

4.1 CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN

Células ARPE-19 fueron cultivadas en medio de cultivo preparado con 50% de medio DMEM (Cölbe, Alemania) y 50% de medio HAMs (Cölbe, Alemania), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 unidades/ml, a 37 °C, una atmósfera, humedad del 90% y 5% de CO₂. Las células fueron transfectadas transitoriamente por electroporación con: 1) siRNA contra hTrx1, (sentido, GUA GAU GUG GAU GAC UGU C, antisentido, GAC AGU CAU CCA CAU CUA C), hTrx2 (sentido, GGA UCU CCU UGA CAA CCU, antisentido, AAG GUU GUC AAG GAG AUC), hNrx, y un siRNA comercial inespecífico como control (siScr; Eurogentech). En cada caso, con el fin de obtener la cantidad de células ARPE-19 necesaria para la transfección, se lavó el medio de cada frasco de cultivo y se trató a las células con tripsina por 2 min, la tripsinización fue terminada utilizando medio de cultivo, las células fueron recolectadas en tubos *falcon*, centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco. Se procedió a la cuantificación de las células utilizando una cámara de Neubauer. La cantidad de medio correspondiente a 5 millones de células fue centrifugada. Las células fueron resuspendidas en un *buffer* de electroporación (HEPES 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, D-glucosa 6 mM, pH 7,15), y mezcladas con 15 µg de siRNA para ser luego sometidas a electroporación, en un volumen final de 550 µl a 230 V, 1050 µF y 500 ohm. Seguidamente, se agregó SFB

directamente a las células antes de sembrarlas en medio fresco. Para una mayor eficiencia de silenciamiento se realizó una segunda transfección a las 72h.

Una vez transfectadas, las células fueron colocadas en un incubador termoestabilizado (Binder), en un ambiente de 1% de O_2 y 5% de CO_2 a 37 °C (hipoxia) por 24 h, seguido de un periodo de 24, 48 o 72 h a 20% de O_2 y 5% de CO_2 a 37 °C (reoxigenación). Finalmente, las células fueron desprendidas por tratamiento con tripsina, lavadas con PBS y lisadas por adición de un *buffer* de lisis (Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, NP-40 0,1%) con adición de inhibidores de proteasas (cOmplete, EDTA-free – Roche Applied Sciences). Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 21.000 x g por 10 min a 4 °C, en una microcentrífuga.

4.2 MORFOLOGÍA EN TRES DIMENSIONES

Las células ARPE-19 transfectadas fueron sembradas en placas de 24 pocillos rellenos con una matriz de colágeno. En primer lugar, se cubrieron los pocillos con una capa de colágeno, con el fin de que la matriz polimerice, se guardaron las placas a 37 °C por 4 h, luego de lo cual se agregó otra capa de colágeno conteniendo las células transfectadas. Se incubaron las placas a 37°C, en una atmósfera, con humedad del 90% y 5% de CO_2 y se agregó medio líquido sobre el colágeno con el fin de evitar que la matriz se seque. Las placas fueron analizadas utilizando un microscopio invertido para cultivo celular. Se tomaron fotografías cada 1 min durante el lapso de 12 h.

4.3 MTT

Las células ARPE-19 transfectadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos y colocadas en el incubador termoestabilizado (Binder), en un ambiente de 1 % de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °C (hipoxia) por 24 h, seguido de un periodo de 24, 48 o 72 h a 20% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °C (reoxigenación). Al finalizar los tratamientos de hipoxia y reoxigenación las células fueron lavadas con PBS y tratadas con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) por 30 min a 37 °C. A continuación, se agregó el detergente necesario para disolver el formazán producido a partir del MTT en células vivas y se dejó reposar en oscuridad por 15 min. Al finalizar este proceso se midió la absorbancia a 570 nm (Fig. 16).

4.4 INMUNOCITOQUÍMICA (ICC) DE CÉLULAS ARPE-19

Las células ARPE-19 transfectadas fueron sembradas en portaobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina en placas de 24 pocillos, para ser luego cultivadas como se indicó previamente (4.1 Cultivo Celular y Transfección). Luego de la inducción de la hipoxia y reoxigenación, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con 4% (p/v) paraformaldehído a 4 °C por 30 min, lavadas nuevamente con PBS, permeabilizadas por 30 min a temperatura ambiente en Tritón X-100 0,4% (v/v), y bloqueadas con BSA (albúmina sérica bovina) 3% (p/v) por otros 30 min. Se incubaron las muestras con anticuerpos primarios (Tabla 3) toda la noche a 4 °C, al día siguiente se procedió a la lavar el anticuerpo primario y las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios (1:400, anti-ratón) por 1 h a temperatura ambiente. La contratinción

nuclear se realizó incubando las muestras en DAPI (Sigma) 1 µg/ml por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando Mowiol como medio de montaje (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y analizadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de 63X /1,4 con aceite de inmersión (Fig. 16).

4.5 WESTERN BLOT(WB) DE CÉLULAS ARPE-19

Los extractos celulares fueron clarificados por centrifugación a 21.000 x g por 10 min a 4°C en una microcentrífuga, los sedimentos descartados y el sobrenadante fue analizado con el fin de determinar la concentración proteica total por el método de Bradford, en una placa de 96 pocillos usando BSA como estándar (tanto la curva de calibración como las muestras se sembraron por triplicado y cuádruplicado, respectivamente, como diluciones independientes). Una vez realizada la cuantificación, se tomaron 50 µg de proteínas totales para cada muestra y se diluyeron en *buffer* de siembra (4X: Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8); glycerol 50%, SDS 5%, azul de Bromofenol 0,1%) en un volumen final de 30 µl. A continuación, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), para lo cual fueron sembradas en un gel en gradiente prefabricado (4–20% Precise gels, Pierce–Thermo Fisher). Posteriormente, las bandas proteicas fueron transferidas a membranas de Polifluoruro de vinildieno (PVDF, Schleicher & Schuell, Alemania) de acuerdo con instrucciones del fabricante. La cantidad total de proteína en la membrana fue revelada utilizando un equipo de detección de imágenes (ChemiDoc™ MP System). Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo

descremada 5% y BSA 1%, en *buffer* Tris salino conteniendo Tween 20 0,05% (TBS-T), por 1 h, para ser luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4°C en agitación (Tabla 1). El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) (1:5000, anti-conejo o anti-ratón, dependiendo del primario utilizado) (Bio-Rad, Richmond CA, EE.UU.) y el sistema de quimioluminiscencia por Luminol (ECL, Amersham). La intensidad lumínica en cada banda fue determinada por medio de un sistema de detección de imágenes (ChemiDoc™ MP System) (Fig. 16).

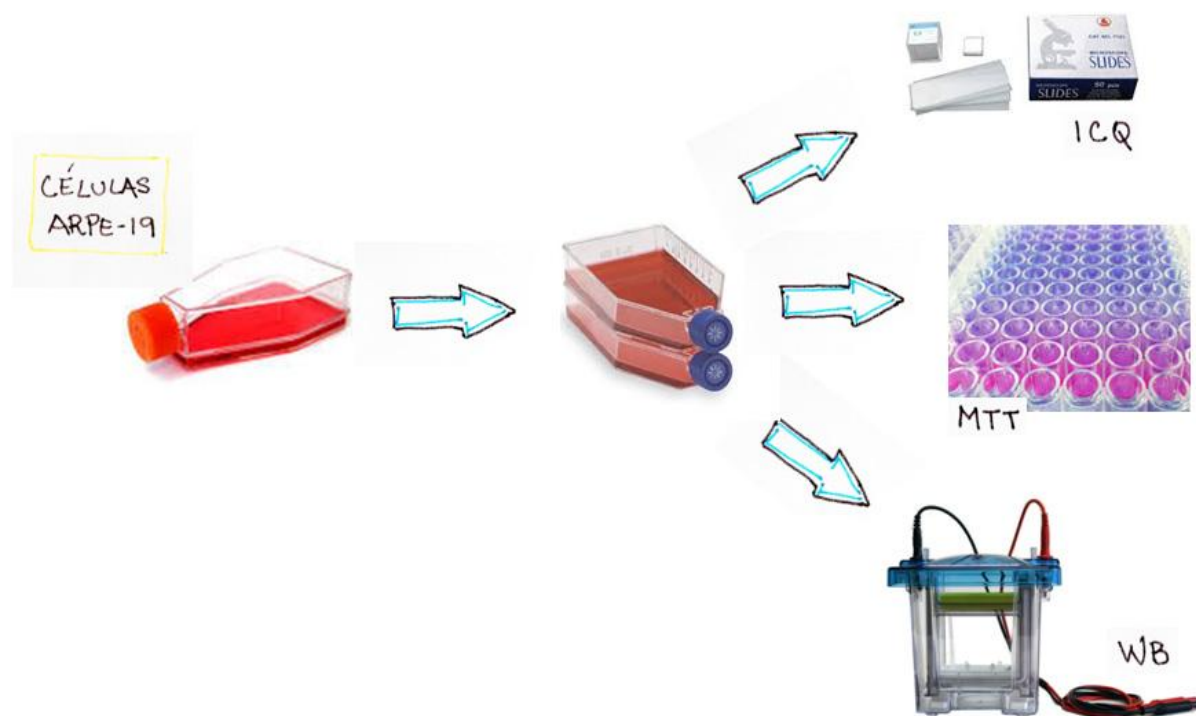


Figura 16: Esquema de los análisis realizados con el fin de estudiar los cambios producidos en células ARPE-19 frente a la hipoxia-reoxigenación y el silenciamiento de Trx1 o Nr1.

5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las intensidades de las bandas de *Western Blot* fueron determinadas utilizando las herramientas provistas por el Chemidoc, cuantificadas usando el programa GelPro 3.1 para Windows y expresadas en relación a los niveles del control. Los diagramas de barras representan la media de al menos 5 muestras independientes \pm ETM (error típico de la media). A los fines de determinar la significación estadística en los cambios de los parámetros bioquímicos y los niveles proteicos, se utilizó el test de ANOVA de dos vías. El nivel de significación fue ajustado al 5%. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa SPSS 15.0 (Chicago, IL, EE.UU.).

Western Blot	
<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
1:500; anti-MCT-4	anti-Conejo (Biorad)
1:200; anti-NeuroD1	anti-Ratón (Biorad)
1: 1000; anti-GFAP	anti-Conejo (Biorad)
1:1000; anti-Trx1	anti-Conejo (Biorad)
1:500; anti-Nrx	anti-Conejo (Biorad)

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para la técnica de western blot.

Inmunohistoquímica	
<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>

1: 500; anti-GFAP	anti-Conejo (Biorad)
1:500; anti-Trx1	anti-Conejo (Biorad)
1:500; anti-Nrx	anti-Conejo (Biorad)

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la técnica de inmunohistoquímica.

Inmunocitoquímica	
<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
1:500; anti-faloidina	Conjugado con fluoróforo
1:500; anti-tubulina	anti-Raton (SigmaAldrich)

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para la técnica de inmunocitoquímica.

RESULTADOS

1 DAÑO Y MODIFICACIONES EN LA RETINA DE MURINOS OCASIONADOS POR HI.

1.1 HISTOLOGÍA

Mediante la técnica histológica de tinción con Hematoxilina-Eosina se han podido distinguir las capas de la retina pertenecientes tanto a animales control (CTL o SHAM) como a animales sometidos a ambos métodos de HI. Se puede observar que tanto los animales que han sufrido una asfixia perinatal (AP) como aquellos sometidos a ligación de carótida (CAR) presentan un engrosamiento en distintas capas de la retina con respecto a los animales CTL y SHAM respectivamente. Tanto las capas ganglionar (CGL), plexiforme interna (CPI), como la de fotorreceptores (CF) son significativamente más anchas en animales AP con respecto a los CTL, mientras que las CGL, CPI, capa nuclear interna (CNI) y CF son más anchas en los animales CAR

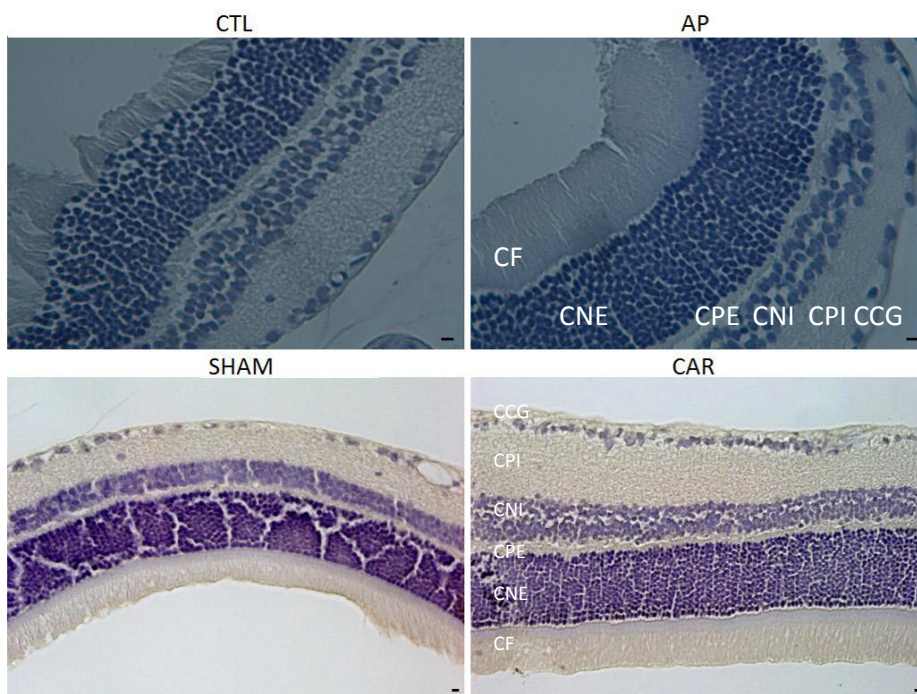


Figura 17: Microfotografías representativas que muestran la tinción de tejido retiniano con hematoxilina/eosina en grupos CTL, SHAM, AP y CAR. Se pueden apreciar con claridad los núcleos celulares de color azul-violeta. Barras de escala: 20 μ m. Abreviaturas CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo carótida.

que en los SHAM. Este aumento de tamaño de distintas capas de la retina resulta indicativo de cambios ocurridos a nivel celular, que podrían relacionarse con un aumento del número de distintos tipos celulares (Abrahan C.E. y col. 2009) o cambios en la morfología celular (Fig. 17 y 18).

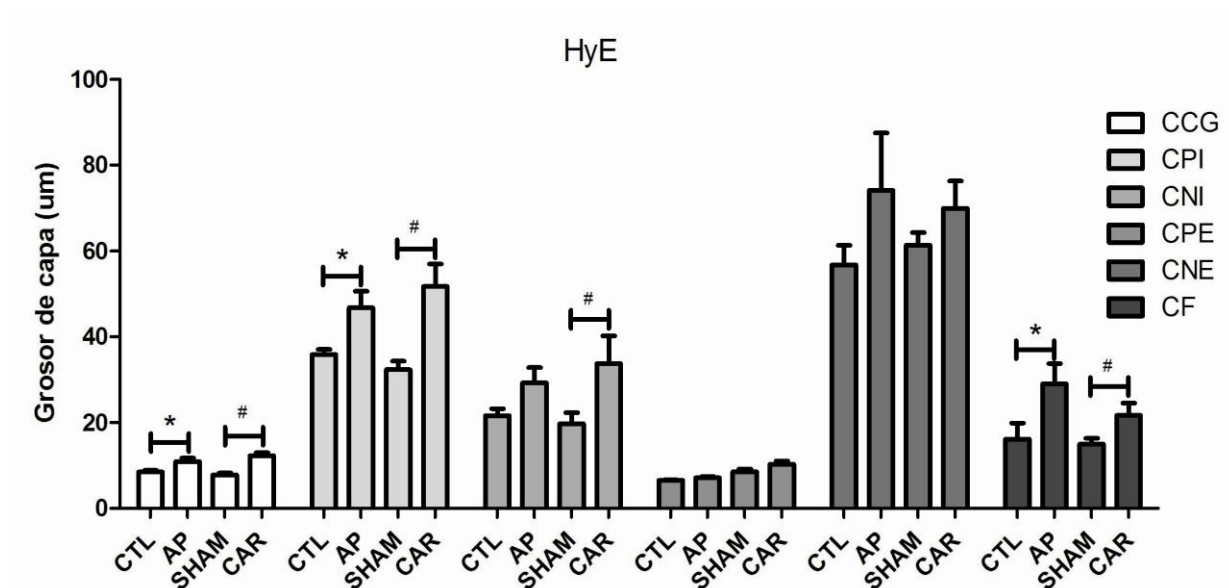


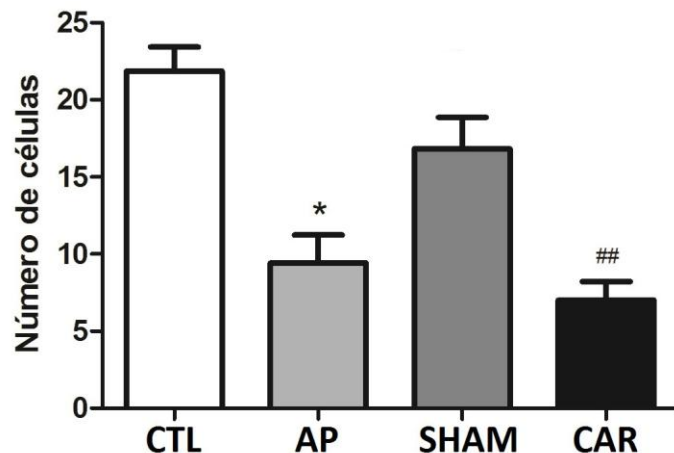
Figura 18: Cuantificación del ancho de las diferentes capas de la retina en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de 5-7 observaciones por cada sujeto experimental en un total de 6 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo carótida; CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; CF, capa de fotorreceptores. *Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,05$); # Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,05$).

1.2 PÉRDIDA NEURONAL

Una de las consecuencias de un evento hipóxico-isquémico es una reducción en el número de neuronas en el tejido afectado (Abrahan C.E. y col. 2009, Saraceno G.E. y col. 2012). Con el fin de determinar si esto ocurre en retinas de ratas sometidas a HI, utilizamos el anticuerpo anti-NeuN como marcador neuronal en cortes histológicos. Se

ha podido observar que hay una disminución del número de células NeuN positivas en aquellos animales sometidos a HI, tanto aquellos expuestos a AP como en animales CAR, con respecto a sus respectivos controles. La disminución se puede observar particularmente en la CGL. Dado que NeuN sólo marca un pequeño número de células

Células ganglionares NeuN positivas



*Figura 20: Cuantificación del número de células NeuN positivas en la capa ganglionar en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de 5 observaciones por cada sujeto experimental en un total de 4-5 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal. *Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,05$); ## Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,01$).*

bipolares (Fig. 19 y 20), no se pudo determinar si hubo cambios en este tipo de neuronas.

Estos resultados nos permitieron identificar cambios permanentes que ocurren en la retina luego de un evento HI en dos modelos diferentes. A partir de estos datos y de datos previos que relacionan la HI con cambios en la producción de ROS (Alonso-Alconada D. y col. 2012) nos planteamos determinar cuál es el

papel que juegan determinadas redoxinas en este evento.

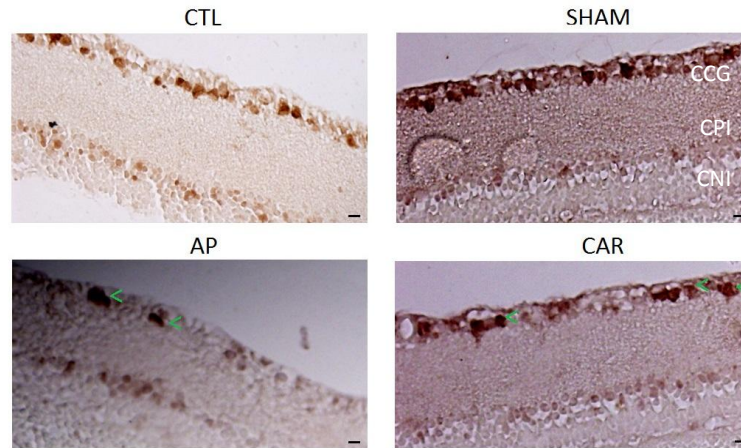


Figura 19: Microfotografías representativas con marcación para NeuN en tejido retiniano sobre cortes pertenecientes a grupos CTL, SHAM, AP y CAR. Barras de escala: 20 μ m. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo ligadura de carótida.

1.3 GLIOSIS REACTIVA

Dado que encontramos un aumento en el grosor de las capas del tejido retiniano, consideramos que estos cambios podrían estar asociados a un daño en dicho tejido y que, por lo tanto, puede existir un aumento de células gliales en tejido del SNC. En

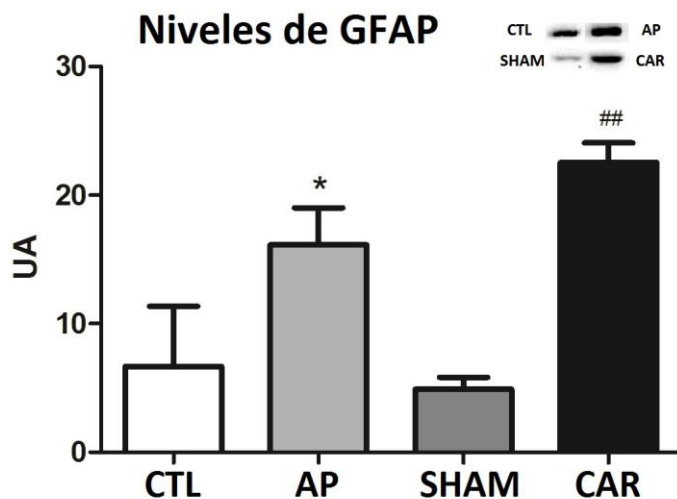


Figura 21: Cuantificación por WB de niveles de GFAP en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de 5-6 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal. *Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,05$); ## Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,01$).

otros estudios se vio que frente a un daño en el SNC, suele ocurrir un aumento en el número y/o el tamaño de células gliales (gliosis reactiva) (Chanana V. y col. 2016; Lv H. y col. 2015). Con el fin de determinar si ocurrieron eventos

asociados a daño del tejido del SNC en animales expuestos a HI, se estudiaron los cambios de expresión de GFAP y MCT4, dos marcadores específicos de células de la glía (Bergersen y col. 2015).

Por su parte, GFAP es un filamento intermedio que se encuentra expresado en células gliales mientras que MCT4 es un transportador de monocarboxilatos específico de este tipo celular (Tomimoto y col. 1993, Bergersen y col. 2015). Mediante la técnica de WB evidenciamos un aumento de GFAP tanto en animales AP como CAR, respecto a sus respectivos controles (Fig. 21). Por otro lado, mediante cortes histológicos e inmunohistoquímica, pudimos evaluar cuales fueron las capas de tejido retiniano en las que se evidenció un aumento de GFAP (Fig. 22 y 23). Observamos que las capas que presentan una mayor gliosis reactiva son la CGL, la CPI y la EPR*.

*Es importante notar que dos de las capas en donde se encontró más gliosis reactiva son la CCG y EPR.

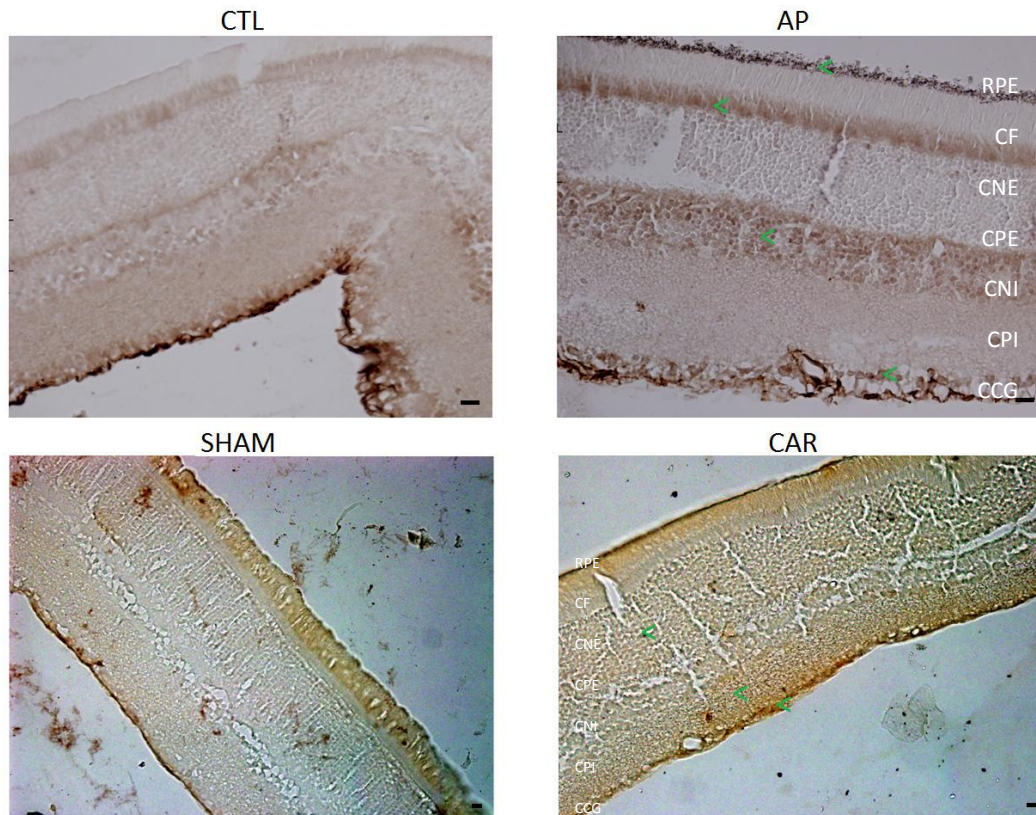


Figura 22: Microfotografías representativas con marcación para GFAP en tejido retiniano. Barras de escala: 20 μ m. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo carótida. Las flechas verdes señalan aquellas capas en donde se ven cambios en la marcación.

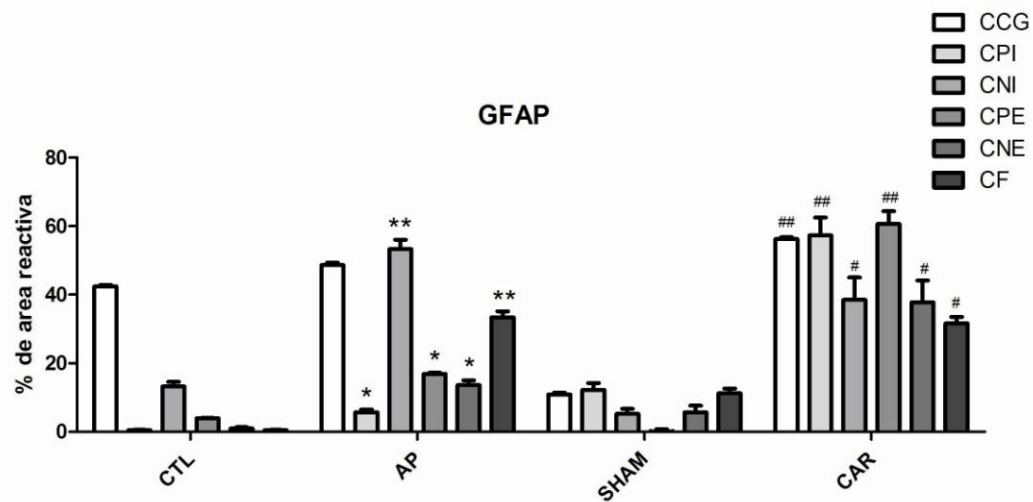


Figura 23: Cuantificación del área reactiva en tejido retiniano GFAP positivo en distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de 5-7 observaciones por cada sujeto experimental en un total de 6 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo carótida; CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; CF, capa de fotorreceptores. *Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,05$); # Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,05$); **Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,01$); ## Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,01$)

Al evaluar los niveles proteicos de MCT4 en retinas de animales sometidos a un evento hipóxico-isquémico, no encontramos cambios en los niveles de este marcador

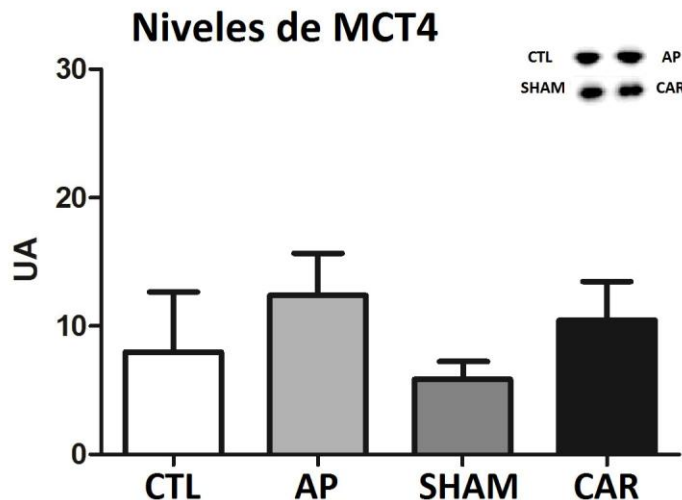


Figura 24: Cuantificación por WB de niveles de MCT4 en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de 5-6 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfisia perinatal.

entre animales AP, CAR y sus controles (Fig. 24).

El aumento de GFAP, pero no de MCT4, podría ser indicativo de que la gliosis reactiva observada no se debe a un aumento en el número de células sino a un incremento del tamaño de las mismas.

2 LOCALIZACION DE TRX EN LA RETINA

Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron generar un mapa de localización de un gran número de proteínas pertenecientes a la familia de las Trx en la retina de murinos (Aon-Bertolino y col. 2011). En este atlas histológico se determinó tanto la presencia de Trx1 y Trx2 como de otras redoxinas, mediante la técnica de inmunohistoquímica. La localización en Trx1 y Trx2 nos ha resultado particularmente

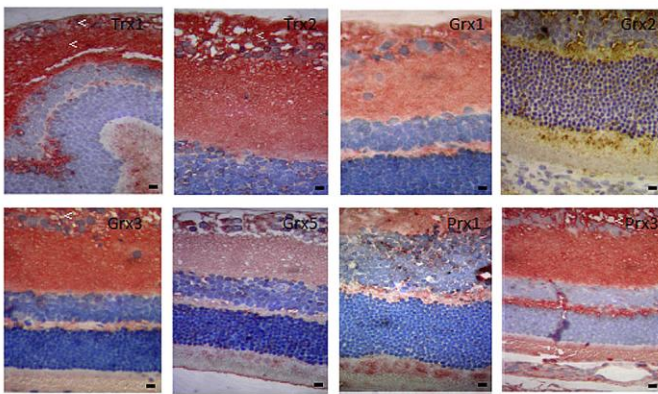


Figura 25: Microfotografías representativas con marcación para Trx1, Trx2, Grx1, Grx2, Grx3, Grx5, Prx1 y Prx3 en tejido retiniano. Barras de escala: 20 μ m

llamativa debido a que se distribuyen mayoritariamente en las CGL, CPI y CNI. Es por esta razón, en principio, que elegimos a estos dos importantes miembros de la familia de las Trx como centro de nuestros estudios posteriores. Por otro lado, los cambios

que encontramos en la expresión de GFAP en el EPR nos sugirieron además incluir en el estudio a Nr_x. Esta redoxina no fue parte del atlas original, sin embargo, estudios recientes del grupo de investigación de Dr. Lillig han demostrado su importancia en procesos de diferenciación celular, evento que puede ocurrir en células de EPR frente a situaciones de estrés (Adijanto y col. 2014; Alizadeh y col. 2001) (Fig. 25).

2.1.1 Trx1, Trx2 y Nr_x en retinas expuestas a HI

2.1.2 Niveles de Trx1, Trx2 y Nr_x en retinas expuestas a HI

Nos propusimos determinar la expresión de Trx1, Trx2 y Nr_x en retinas de animales jóvenes expuestos a HI perinatal utilizando la técnica de WB. Encontramos que no existen cambios significativos en la expresión de Trx2 en ninguno de los modelos utilizados. En cuanto a los niveles de Trx1, observamos una disminución significativa de Trx1 en animales expuestos a AP con respecto a su control. En el modelo de ligadura de carótida, al igual que en el modelo de asfixia perinatal, se observa una disminución de los niveles de Trx1 en los animales CAR en comparación con su control. Por último, respecto a Nr_x observamos un aumento significativo de los

niveles de esta redoxina tanto en animales AP como CAR, respecto a sus respectivos controles (Fig. 26 y 27)*.

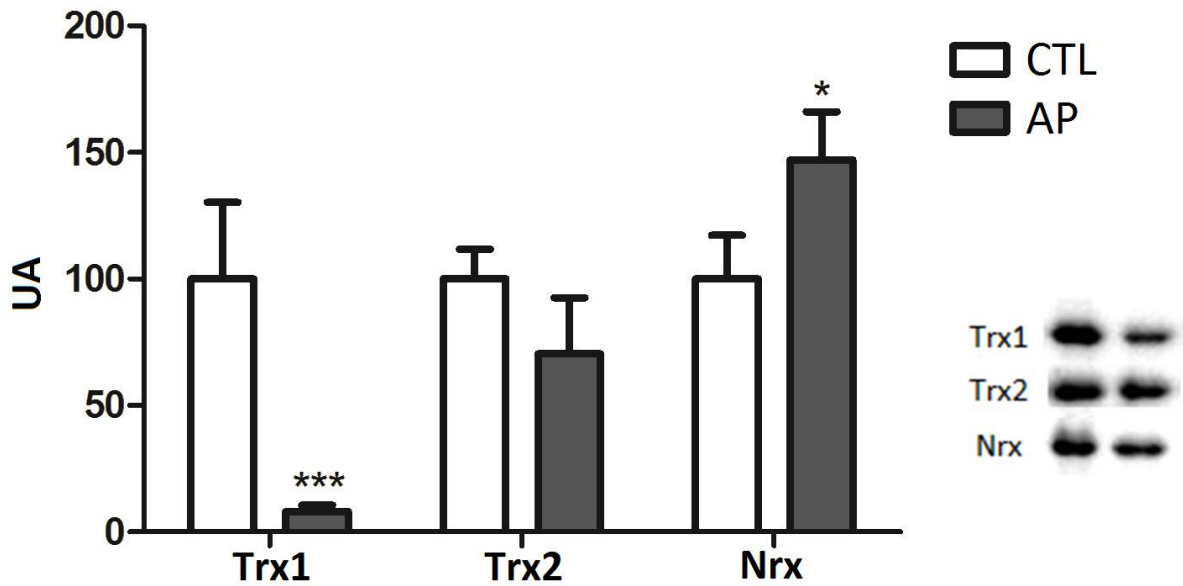


Figura 26: Cuantificación por WB de niveles de Trx1, Trx2 y Nrx en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm SD de un total de 5-6 animales por grupo. Abreviaturas: CTL, grupo control; PA, grupo de asfixia perinatal. *Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,05$); ***Diferencias significativas entre CTL y AP ($p < 0,001$)

*Notar que la disminución de Trx1 es mucho más marcada en el modelo de asfixia perinatal.

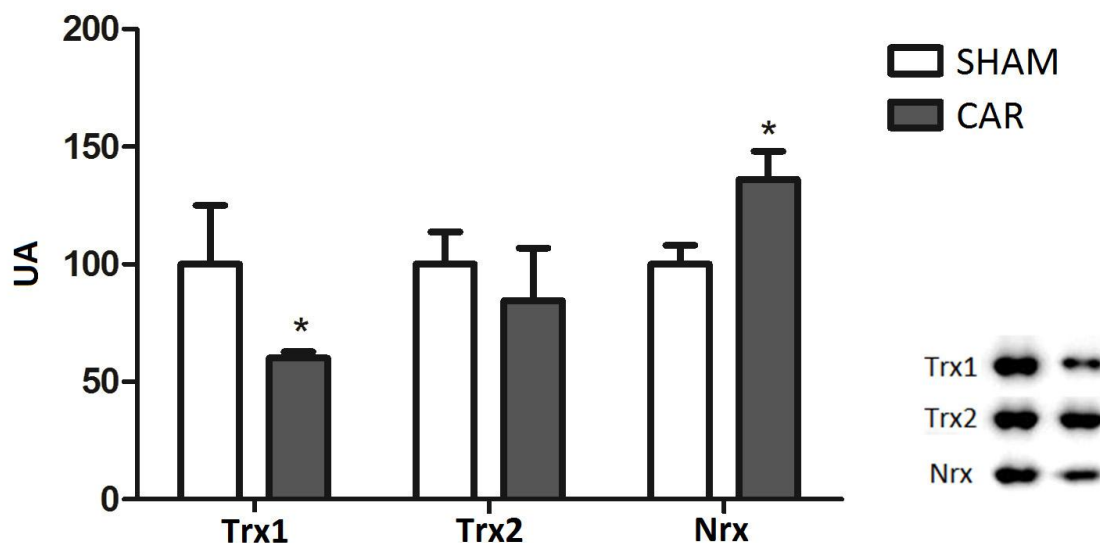


Figura 27: Cuantificación por WB de niveles de Trx1, Trx2 y Nrxa en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm SD de un total de 5-6 animales por grupo. Abreviaturas: SHAM, grupo control de cirugía; CAR, grupo ligadura de carótida. *Diferencias significativas entre SHAM y CAR ($p < 0,05$).

2.1.3 Patrón de expresión en retinas expuestas a HI

A partir de los resultados obtenidos por WB, decidimos elucidar cuales eran las capas de la retina que evidencian los cambios de expresión de Trx1 y Nrxa. Mediante la técnica de IHQ, hemos podido observar una disminución de la inmunotinción con anti-Trx1 en la EPR, CNI y la CGL en aquellos animales AP en comparación con el CTL, mientras que en animales CAR encontramos un aumento de la inmunotinción de Trx1 en todas las capas (Fig 28 paneles superiores).

Al analizar el patrón de localización de Nrxa observamos una mayor expresión en la CPI así como en la CF en animales AP, respecto a animales CTL, mientras que en

los animales CAR vimos un aumento en la marcación de la CGL y la CF (Fig 28 paneles inferiores).

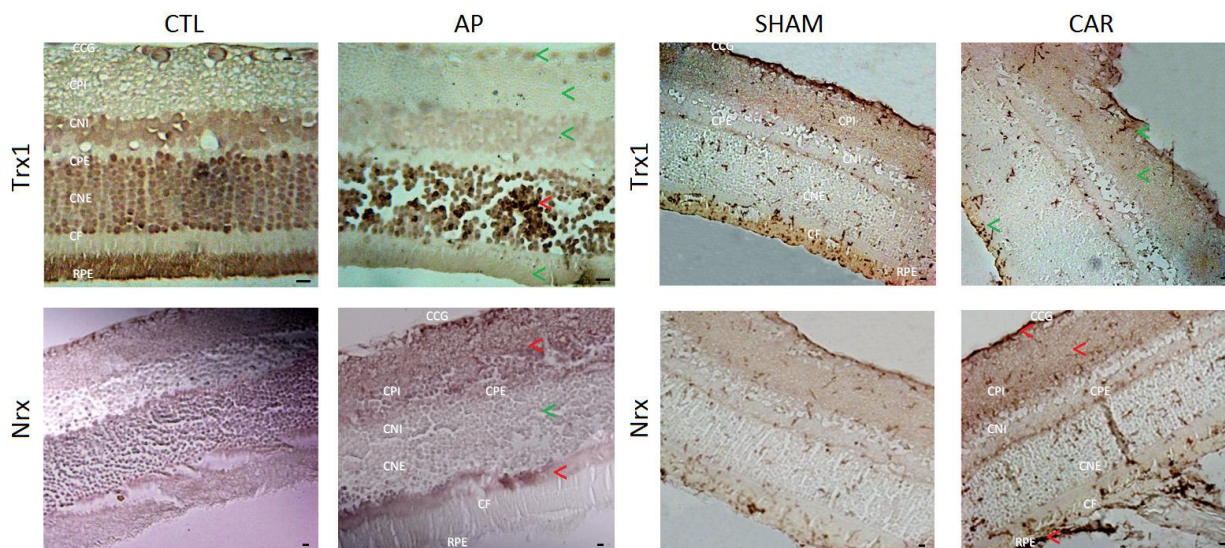


Figura 28: Microfotografías representativas con marcación para Trx1 y Nr1x en tejido retiniano. Barras de escala: 20 μ m. Las flechas rojas señalan capas en la cual la marcación se encuentra elevada con respecto al control mientras que las flechas verdes señalan capas en las cuales hay una disminución de la marcación con respecto al control. Abreviaturas: CTL, grupo control; SHAM, grupo control de cirugía; AP, grupo de asfixia perinatal; CAR, grupo carótida

Los resultados obtenidos son un indicativo de que tanto Trx1 como Nr1x juegan un papel esencial durante el evento HI y que su expresión se encuentra modificada en animales jóvenes sometidos a HI, probablemente en respuesta a los distintos cambios permanentes que ocurren en el SNC debido a una HI perinatal (Blanco y col. 2015, Romero y col. 2015, Galeano y col. 2014).

3 ROL DE TRX1, TRX2 Y NRX EN HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

Con el fin de arrojar luz sobre el papel que juegan las redoxinas de interés, durante la hipoxia y posterior reoxigenación que forman parte del evento hipóxico-

isquémico, decidimos utilizar una línea celular espontánea y establecida de EPR, llamada ARPE19. Esta línea celular proviene de la retina de un joven de 19 años y mantiene varias características del EPR, incluyendo los bordes celulares, una apariencia de “adoquin” al formar una monocapa y una clara pigmentación (Dunn y col. 1996).

3.1 MORFOLOGÍA DE CÉLULAS ARPE-19

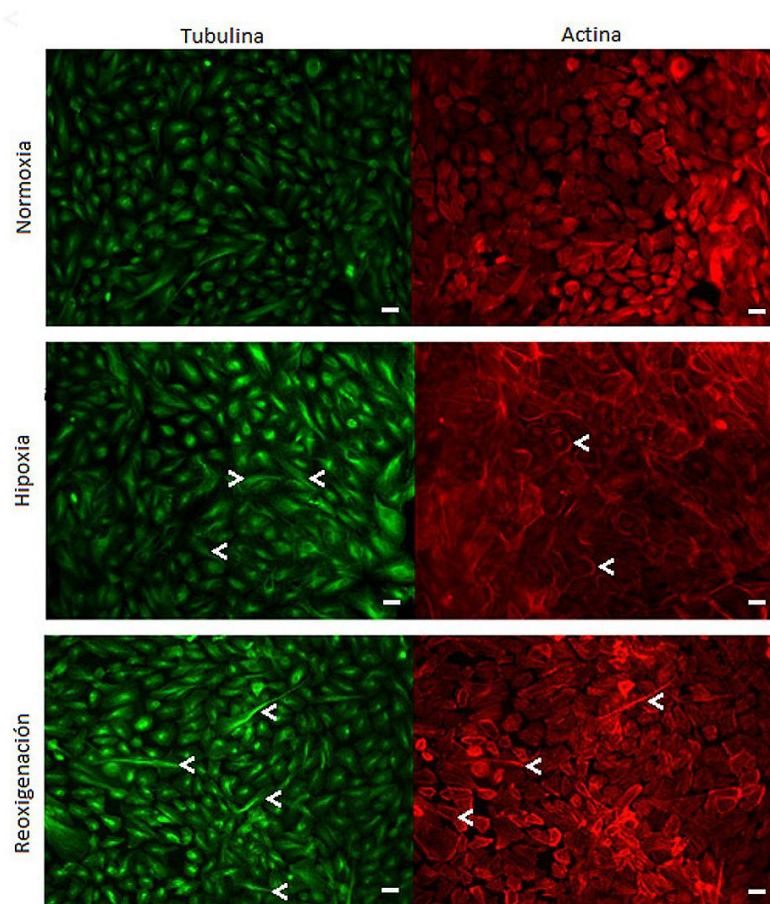


Figura 29: Microfotografías representativas con marcación para tubulina (verde) y actina (rojo) en células ARPE-19 para todos los grupos experimentales (normoxia, hipoxia, reoxigenación). Barras de escala: 20 μ m. Las flechas blancas indican aquellas células en donde se evidencia el cambio morfológico.

Con el fin de determinar cambios en la morfología de las células ARPE-19 expuestas a hipoxia y a reoxigenación utilizamos como marcadores a dos proteínas del citoesqueleto: tubulina y actina. Mediante la técnica de ICC hemos podido observar que tanto aquellas células expuestas a hipoxia como aquellas expuestas a hipoxia y una posterior reoxigenación presentan un mayor tamaño, el

cual quedó evidenciado por ambos marcadores. Por otro lado, observamos una clara elongación de la matriz celular en aquellas células expuestas a reoxigenación, que

resulta más evidente con la marcación para tubulina. Con la tinción de actina, observamos que las células ARPE-19 pierden su distribución ordenada, comienzan a tomar más contacto entre sí (hipoxia) y pasan a encimarse y desordenarse cuando son expuestas a reoxigenación (Fig. 29).

3.2 VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN

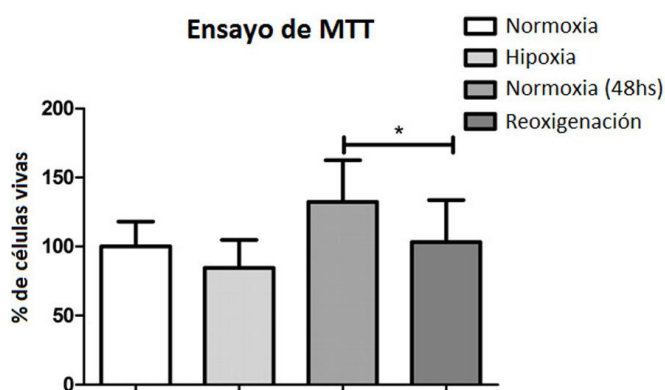


Figura 30: Cuantificación de células vivas por ensayo de MTT en los distintos grupos experimentales (normoxia, hipoxia y reoxigenación). Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos.

*Diferencias significativas entre reoxigenación y normoxia (48hs) ($p < 0,05$)

células nuevas (proliferación) o células que han sobrevivido a los eventos de hipoxia y reoxigenación (viabilidad o sobrevivencia)*. No hemos podido observar cambios en la viabilidad/proliferación celular de células expuestas a hipoxia, respecto a su control. Sin embargo, evidenciamos una disminución significativa en células ARPE-19 expuestas a reoxigenación (Fig. 30).

Para determinar de que manera la hipoxia y reoxigenación afectan la viabilidad/proliferación celular realizamos el ensayo de MTT en la línea ARPE-19. Este ensayo sólo permite ver el número de células vivas al momento de realizar la medición, por lo que no podemos distinguir entre

*Es por esta razón que el ensayo de MTT mide el producto dado por los efectos de la viabilidad y la proliferación, a este producto lo llamamos viabilidad/proliferación y no debe entenderse como un cociente entre ambos

3.3 MARCADORES GLIALES Y NEURONALES

Trabajos previos, mostraron que las células del EPR comienzan a perder sus características epiteliales y empiezan a diferenciarse tanto a células gliales como neuronales al ser expuestas a situaciones de estrés (Carr y col. 2011; Alizadeh y col.

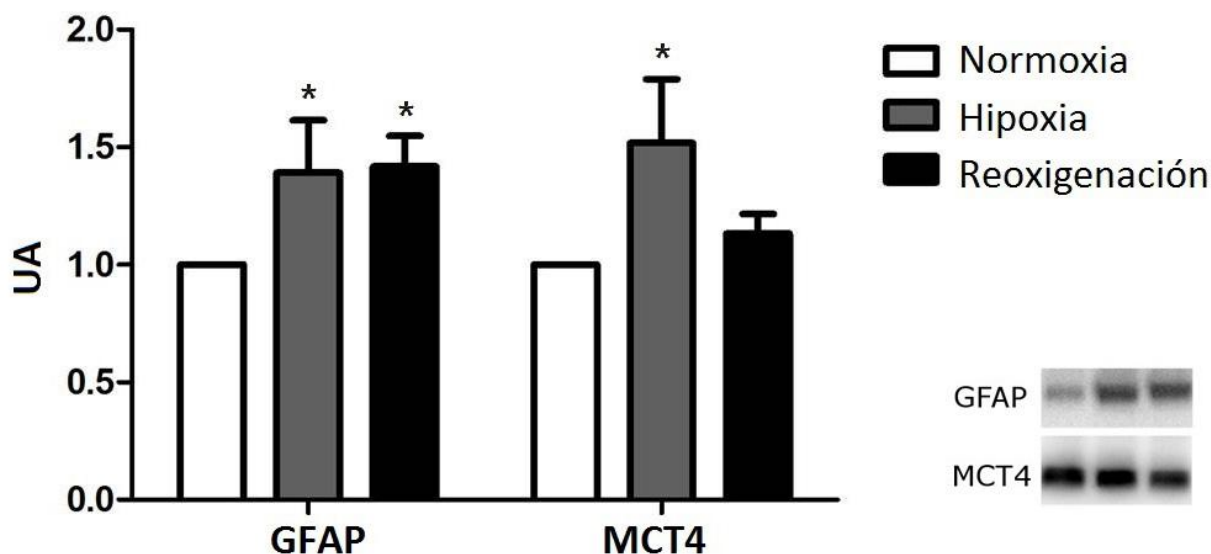


Figura 31: Cuantificación por WB de niveles de GFAP y MCT4 en células ARPE-19 en los distintos grupos experimentales (normoxia, hipoxia y reoxigenación). Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre hipoxia/reoxigenación y normoxia ($p < 0.05$)

2001). Con el fin de dilucidar si esto también ocurre en células ARPE-19 sometidas a hipoxia-isquemia, nos propusimos determinar los si aumenta o disminuye la expresión de distintos marcadores gliales y neuronales: GFAP, MCT4, neurofilamentos pequeños (NF(p)) y un activador transcripcional que se encuentra involucrado en la vía de formación de células ganglionares tempranas, NeuroD1. Pudimos observar que los niveles de GFAP se encuentran elevados tanto en células sometidas a hipoxia como a reoxigenación, mientras que los valores de MCT4 solo se ven incrementados en células expuestas a hipoxia (Fig. 31). Por otro lado, hemos podido comprobar que los niveles de NF(p) se mantienen constantes, tanto en hipoxia como en reoxigenación, mientras

que los niveles de NeuroD1 disminuyen en células expuestas a hipoxia con respecto al control, con una mayor reducción frente a la reoxigenación (Fig. 32).

3.4 TRX1 Y NRX FRENTE A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

Hemos podido comprobar que el evento de hipoxia-reoxigenación genera cambios en la morfología, la proliferación/viabilidad y la diferenciación en células ARPE-19. A continuación nos interesó saber cuáles son los cambios en la expresión de

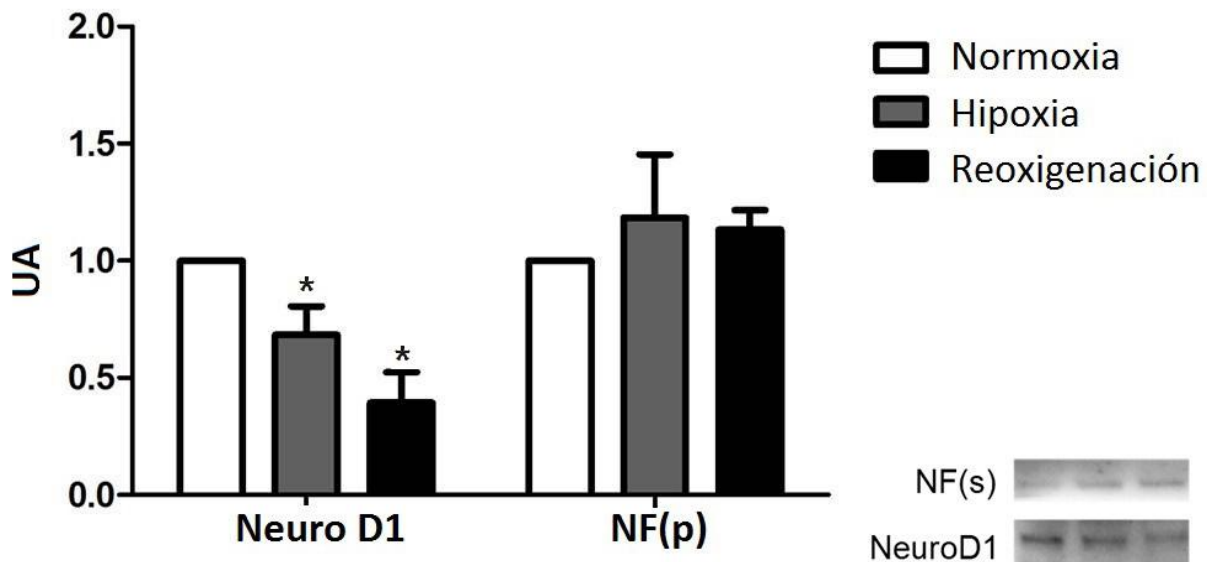


Figura 32: Cuantificación por WB de niveles de NeuroD1 y NF(p) en células ARPE-19 en los distintos grupos experimentales (normoxia, hipoxia y reoxigenación). Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre hipoxia/reoxigenación y normoxia ($p < 0,05$)

nuestras redoxinas de interés, Trx1 y Nrxx, ya que son redoxinas que se encuentran relacionadas con la viabilidad/proliferación y la diferenciación celular (Funato y col. 2007; Lillig y col. 2007).

Pudimos observar, mediante WB, que existe un aumento de los niveles tanto de Trx1 como de Nr1 en situaciones de hipoxia y reoxigenación (Fig. 33), en concordancia con la bibliografía y que además sugieren una relación entre los efectos de la hipoxia-isquemia y las redoxinas Trx1 y Nr1.

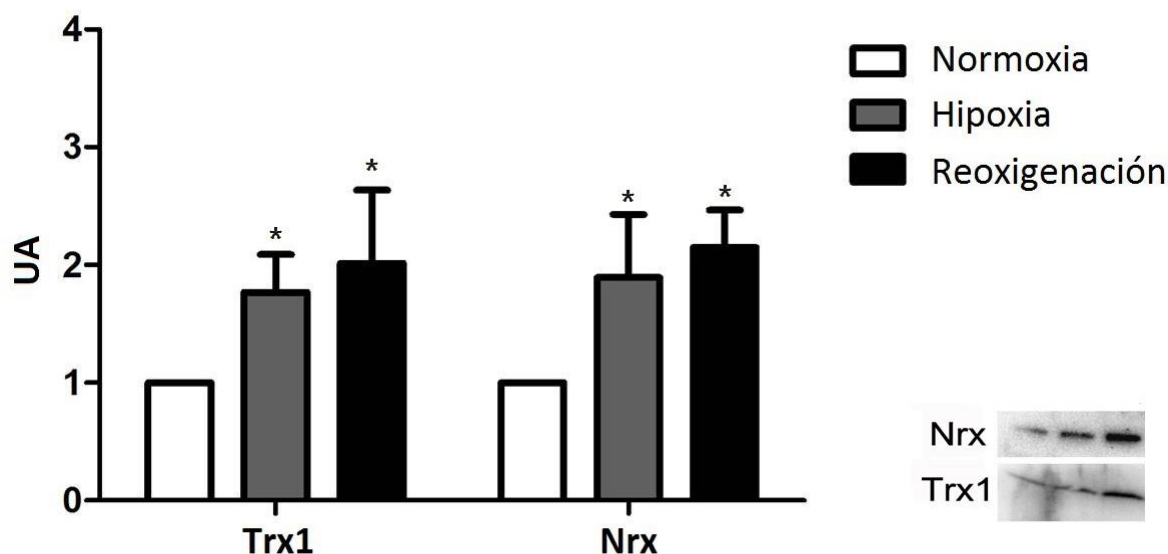


Figura 33: Cuantificación por WB de niveles de Trx1 y Nr1 en células ARPE-19 en los distintos grupos experimentales (normoxia, hipoxia y reoxigenación). Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre hipoxia/reoxigenación y normoxia ($p < 0,05$)

3.5 NIVELES DE TRX1 A LO LARGO DE LA REOXIGENACIÓN

Al evaluar los datos obtenidos en los modelos animales y compararlos con los datos obtenidos en el modelo celular de hipoxia-reoxigenación encontramos que los niveles de Trx1 disminuyen en animales sometidos a HI perinatal, mientras que en células expuestas a hipoxia-reoxigenación los valores de Trx1 aumentan significativamente (Fig. 34). Estos resultados, aparentemente contradictorios, nos han

llevado a evaluar el comportamiento de esta redoxina a mayores tiempos de reoxigenación en el modelo celular. Mediante la técnica de WB, determinamos que en células ARPE-19 expuestas a 24hs de reoxigenación, los valores de Trx1 siguen siendo mayores que los datos del control, mientras que a las 48hs comienzan a disminuir. Finalmente, a las 72hs de reoxigenación, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de Trx1 y los del control que no ha sido expuesto a hipoxia-reoxigenación (Fig. 34).

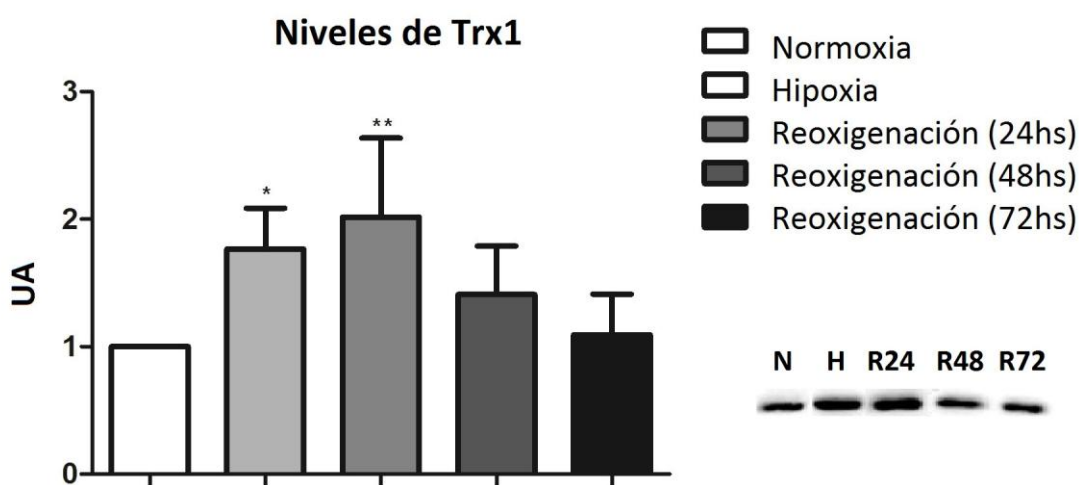


Figura 34: Cuantificación por WB de niveles de Trx1 en células ARPE-19 en los distintos grupos experimentales (normoxia, hipoxia, reoxigenación 24h, reoxigenación 48h y reoxigenación 72h). Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre hipoxia y normoxia ($p < 0,05$); **Diferencias significativas entre Reoxigenación (24hs) y normoxia ($p < 0,01$)

4 IMPORTANCIA DE TRX1 Y NRX EN EPR

A partir de los resultados obtenidos hasta aquí, nos planteamos determinar cuál es el rol que juegan las redoxinas de interés en el modelo celular utilizado. Para ello, transfectamos, por electroporación, la línea ARPE-19 con diferentes siRNAs específicos para los genes Trx1, Trx2 y Nr1, con el fin de generar sus *knock downs* correspondientes.

4.1 EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

En primer lugar, determinamos la eficiencia de transfección utilizando Lifeactin-mCHERRY, vector que al integrarse al ADN permite la expresión de una proteína de actina fusionada con una proteína fluorescente que emite en la longitud de onda del rojo ($\lambda=594\text{nm}$).

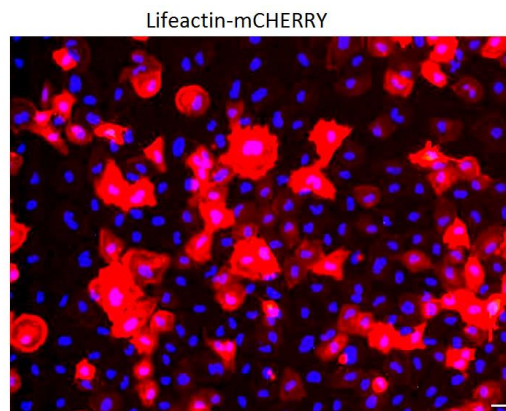


Figura 35: Microfotografía representativa con marcación nuclear (DAPI; azul) y de actina (Lifeactin-mCHERRY; rojo) en células ARPE19. Barras de escala: 20 μm .

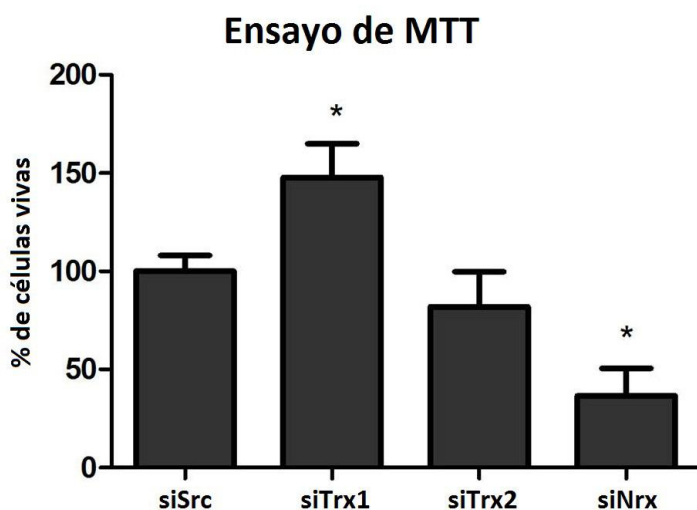


Figura 36: Cuantificación de células vivas por MTT en los distintos grupos experimentales (siSrc, siTrx1, siTrx2 y siNrx). Las barras y barras de errores muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre siTrx1/siNrx y siSrc ($p < 0,05$)

Pudimos establecer una eficiencia de transfección idónea del 95% (Fig. 35)*.

4.2 VIABILIDAD/PROLIFERACIÓN CELULAR

A partir de los *knock downs* obtenidos para las redoxinas de interés, evaluamos la

viabilidad/proliferación celular. No observamos diferencias significativas en los niveles de viabilidad/proliferación en aquellas células que no expresaban Trx2 en comparación con el control. Por otro lado, pudimos ver un aumento de la viabilidad/proliferación en células silenciadas para Trx1 y una disminución en células que no expresan Nrx (Fig. 36). Estos resultados podrían indicar que los altos niveles de Trx1, debidos al evento de hipoxia-reoxigenación, son los responsables de la disminución de la

*Se puede apreciar que la morfología de las células ARPE-19 transfectadas varia ligeramente con respecto a la observada en células *Wild type* (Fig.29 Normoxia), posiblemente por el estrés causado por la electroporación.

viabilidad/proliferación, más allá de los efectos que pueda tener Nr_x cuya acción podría estar siendo superada por la de Trx1.

4.3 CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR

En primer lugar evaluamos la morfología general de las células ARPE-19 con

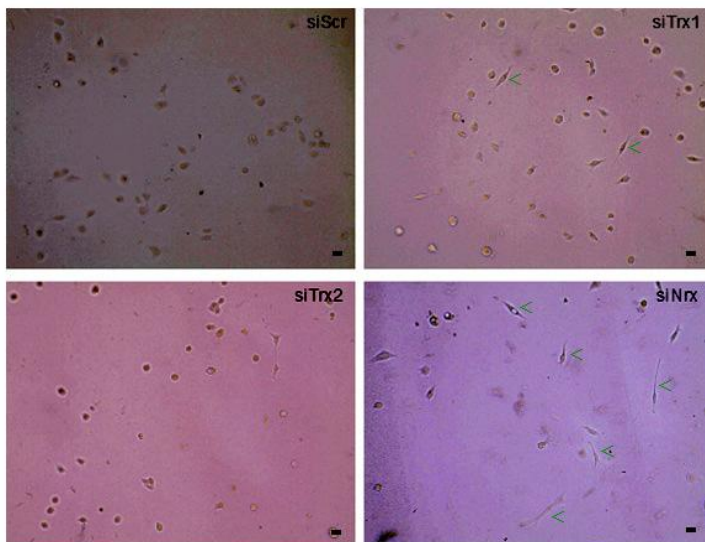


Figura 37: Microfotografías representativas de células ARPE-19 transfectadas con todos los plásmidos utilizados (siScr, siTrx1, siTrx2 y siNr_x). Las flechas verdes señalan aquellas células que presentan una morfología más elongada.

sus *knock downs* específicos, sin utilizar ningún método de tinción. Determinamos que, entre aquellas células que no expresan Trx1 o Nr_x, un mayor número presenta una morfología más elongada que aquellas transfectadas con el vector vacío (plásmido control) o con siTrx2 (Fig. 37). Luego

realizamos una IHQ, utilizando actina y tubulina como marcadores. De esta forma, pudimos observar un mayor número de nanotúbulos de actina en células en las cuales las redoxinas fueron silenciadas, indicando una situación de estrés celular. Así mismo, pudimos corroborar que existe un claro cambio en la morfología general de células que no expresan las redoxinas, estas células presentan un aumento de tamaño y una forma más ahusada, que se puede ver tanto en la marcación con actina como con tubulina (Fig. 38)*.

*En las células ARPE-19 transfectadas con el vector vacío se puede apreciar que si bien su forma no es elongada, no presentan la clara morfología adoquinada de células tipo salvaje. De todas formas resulta evidente que la ausencia de las redoxinas genera mayores cambios en la morfología de estas células.

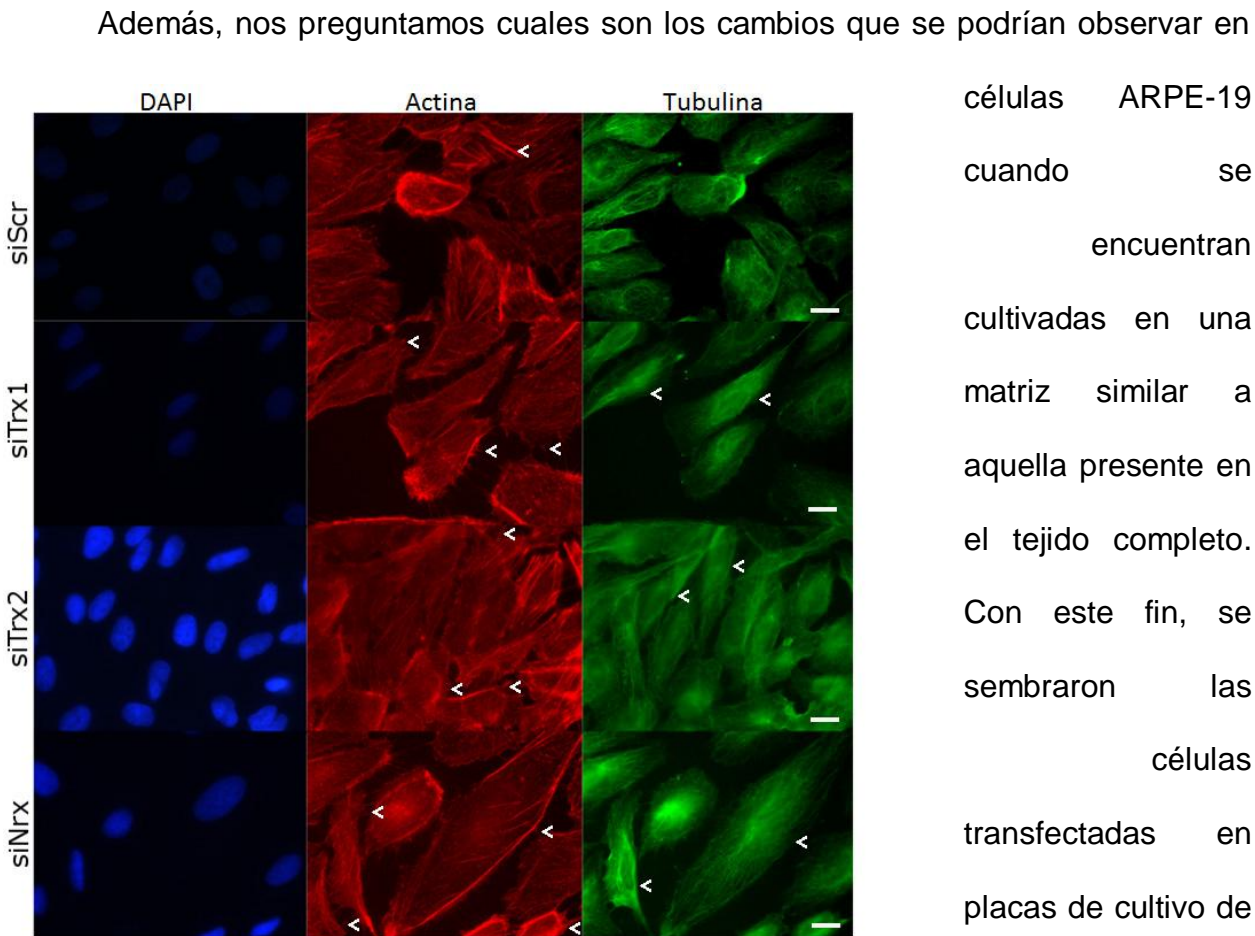


Figura 38: Microfotografías representativas de células ARPE-19 transfectadas con todos los plásmidos utilizados (siSrc, siTrx1, siTrx2 y siNrx) en las cuales se han marcado los núcleos (DAPI; azul), actina (rojo) y tubulina (verde). Barras de escala: 20 μ m. Las flechas en las fotografías con marcación para actina señalan los nanotúbulos de actina, mientras que las flechas en las fotografías con marcación para tubulina señalan aquellas células que presentan una morfología más ahusada.

una matriz de colágeno donde pueden adquirir una forma tridimensional (3D). Por un lado, no observamos cambios en la morfología de las células ARPE-19 que no expresan Trx1 y Trx2 con respecto al control. Por otro lado, pudimos evidenciar una marcada modificación morfológica en las células silenciadas para Nrx, las cuales presentaron forma estrellada con largas proyecciones celulares (Fig. 39)*, similares a las que se encuentran en células astrocitarias (Formichella C.R. y col. 2014).

*En las imágenes capturadas durante 24hs se pudo corroborar que estas células permanecían vivas y en movimiento.

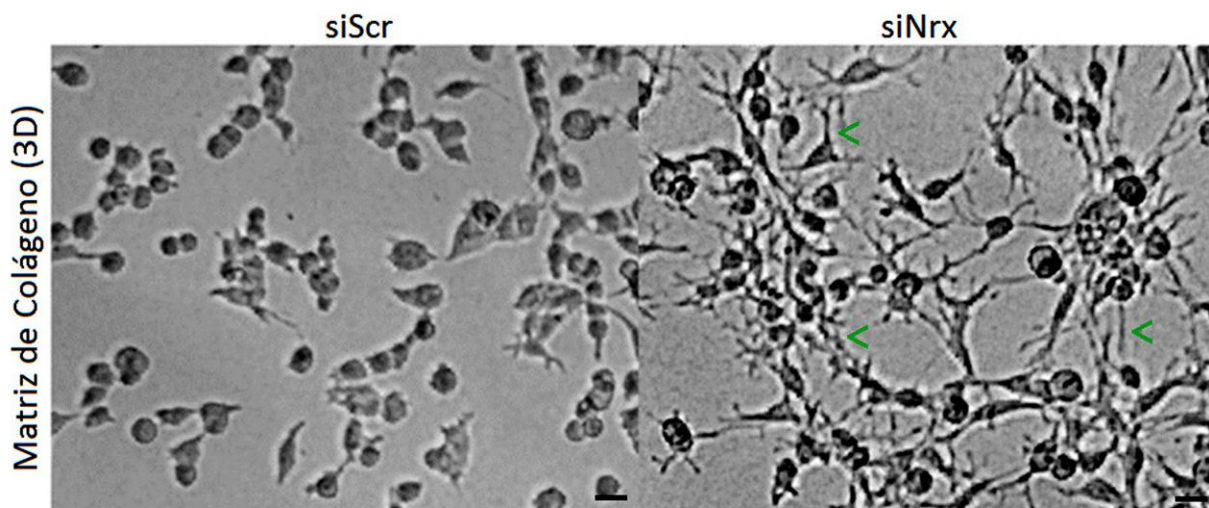


Figura 39: Microfotografías representativas de células ARPE-19 en soporte de 3 dimensiones. Las flechas verdes señalan las proyecciones celulares. Barras de escala: 20 μ m.

4.4 MARCADORES GLIALES Y NEURONALES

A continuación, nos propusimos determinar la expresión de los marcadores gliales y neuronales, utilizados previamente, en células silenciadas tanto para Trx1 como Nrx, dado que son las únicas que presentaron cambios en viabilidad/proliferación (Nrx y Trx1) y morfología celular (Nrx) bajo hipoxia-reoxigenación (Fig. 40). Por un lado, observamos un aumento significativo de los niveles de GFAP y una disminución de MCT4 en células en las cuales Nrx se encontraba silenciado (Fig. 40). Debido a que GFAP, además de ser un marcador glial, es marcador de diferenciación temprana (Bramanti y col. 2010), estos resultados podrían estar indicando que la diferenciación celular que ocurre frente a la falta de expresión de Nrx es aún una diferenciación temprana entre las 24 y 72 h. Por otro lado, en células silenciadas para Nrx no encontramos diferencias en los niveles de NF(p), mientras que sí evidenciamos una disminución significativa de NeuroD1, con respecto a las células control (Fig. 40). La

disminución de NeuroD1 podría estar indicando que estas células están en un estadio poco avanzado de diferenciación y que además éste se encuentra dirigido hacia la producción de células gliales, debido al aumento de GFAP. Obtuvimos resultados similares para células en las cuales Trx1 se encontraba silenciado, respecto a los marcadores GFAP y NF(p) (Fig. 40). En cuanto a NeuroD1 y MCT4, sus niveles no presentaron diferencias significativas con respecto al control frente al silenciamiento de Trx1 (Fig. 40), lo que indicaría que Trx1 no se encuentra relacionado con la diferenciación celular en ARPE-19.

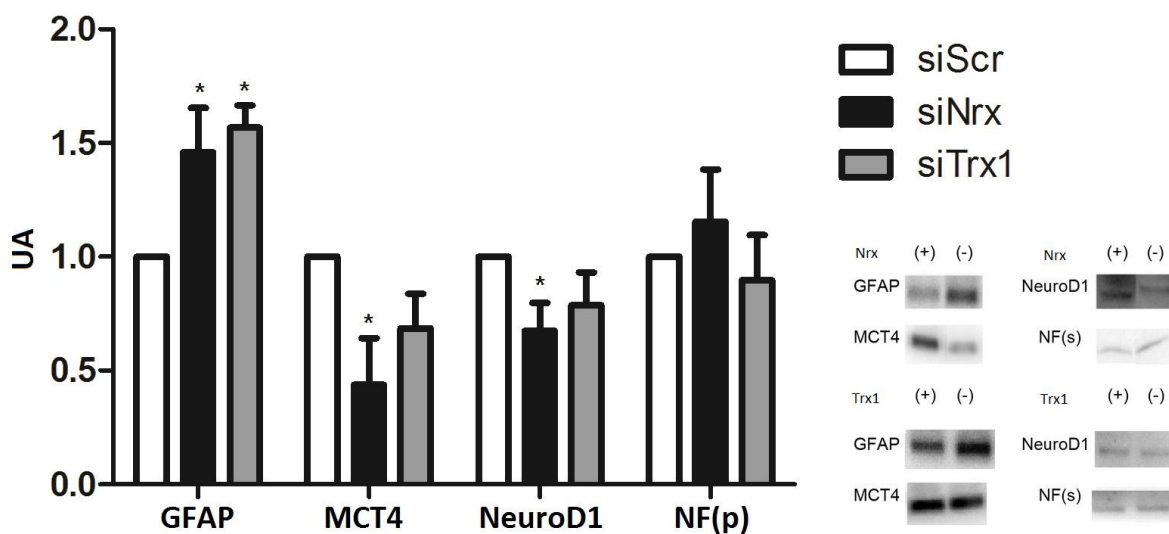


Figura 40: Cuantificación por WB de niveles de GFAP, MCT4, NeuroD1 y NF(p) en células ARPE-19 con Nrx o Trx1 silenciadas. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 4 experimentos. *Diferencias significativas entre siNrx/siTrx1 y siScr ($p < 0,05$)

5 TRATAMIENTO CON TRX1

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis nos han llevado a plantear el potencial de estas redoxinas como agente terapéutico frente a la HI

perinatal. Con el fin de evaluar esta hipótesis, procedimos a utilizar Trx1 recombinante como tratamiento post-injuria en el modelo de ligadura de la arteria carótida común.

5.1 GLIOSIS REACTIVA

Como ya hemos mencionado, la gliosis reactiva es una consecuencia típica del

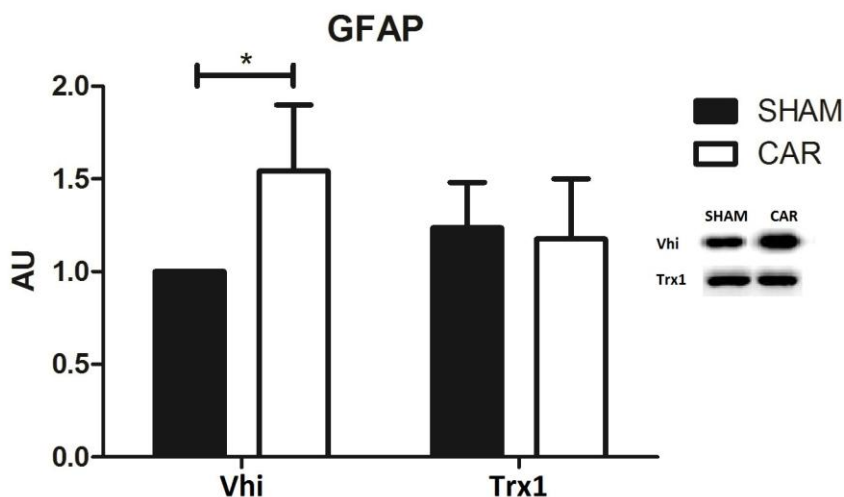


Figura 41: Cuantificación por WB de niveles de GFAP en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 6 animales por grupo. Abreviaturas: Abreviaturas: SHAM, grupo control de cirugía; CAR, grupo carótida; Vhi, Vehículo. *Diferencias significativas entre grupos SHAM y CAR ($p < 0,05$)

los niveles de GFAP presentan un aumento significativo en los animales del grupo CAR tratado con vehículo (Vhi; *buffer* fosfato), respecto al CTL-Vhi. En el tejido retiniano tratado con vehículo se ve el aumento de GFAP producido por la ligadura de la carótida. No encontramos diferencias significativas entre el grupo CAR tratado con Trx1 y su control (SHAM) tratado con Trx1. Estos a su vez no presentan diferencias con respecto al CTL-Vhi, indicando que el tratamiento con esta redoxina no produce cambios en animales que han sido expuestos a una HI (Fig. 41). Estos resultados podrían estar indicando que Trx1 ejerce un efecto terapéutico frente al daño producido por la HI ya

daño en el SNC. Es por ello que planteamos determinar si ocurren cambios en los niveles de GFAP en animales expuestos a injuria y tratados con Trx1 recombinante. Mediante la técnica de WB, observamos que

que al tratar animales expuestos a HI con esta redoxina los niveles de GFAP vuelven a ser los mismos que en animales no expuestos.

5.2 PÉRDIDA NEURONAL

Con el fin de determinar si existe una recuperación de la pérdida neuronal debido al tratamiento con Trx1 recombinante, medimos por WB los niveles del marcador de NF(p). En este caso no pudimos observar diferencias significativas entre

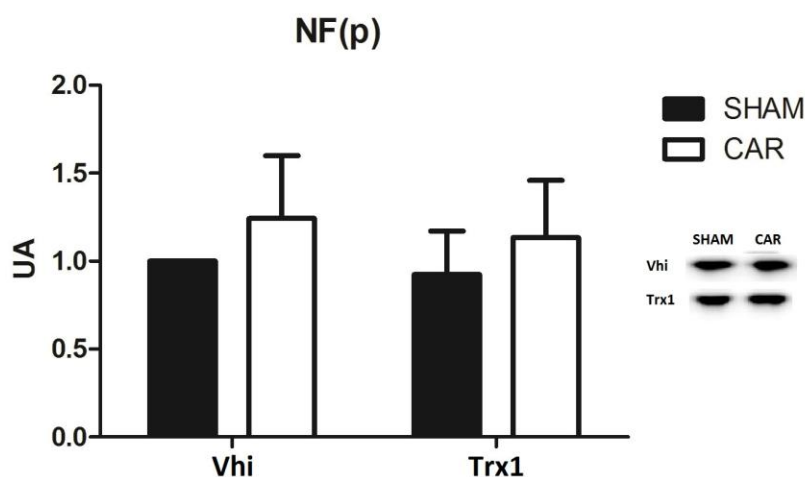


Figura 42: Cuantificación por WB de niveles de NF(p) en tejido retiniano en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 6 animales por grupo. Abreviaturas: Abreviaturas: SHAM, grupo control de cirugía; CAR, grupo carótida; Vhi, Vehículo.

ninguno de los grupos (Fig. 42).

5.3 DESARROLLO

NEUROMUSCULAR Y

NEUROCONDUCTUAL

Como vimos, los resultados bioquímicos obtenidos por WB son un claro indicador de la

efectividad terapéutica de Trx1. Es por este motivo que nos propusimos determinar si se observan cambios a nivel de desarrollo de los ojos, medido por el momento de apertura de los mismos. Aquellos animales pertenecientes al grupo CAR-Vhi presentaron un retraso en el día de apertura de los ojos. Sin embargo, no se pudo apreciar una reducción de dicha modificación en animales CAR-Trx1 (Fig. 43). A su vez,

analizamos el desarrollo neurológico de dicho tejido verificando la presencia del reflejo de parpadeo. Si bien se encontró un retraso en la aparición del reflejo en animales CAR-Vhi con respecto a los animales CTL-Vhi, se vio una reversión de este retraso en animales CAR-Trx1 (Fig. 43), lo que indica que la inyección de Trx1 recombinante podría estar teniendo un efecto benéfico en animales sometidos a HI perinatal.

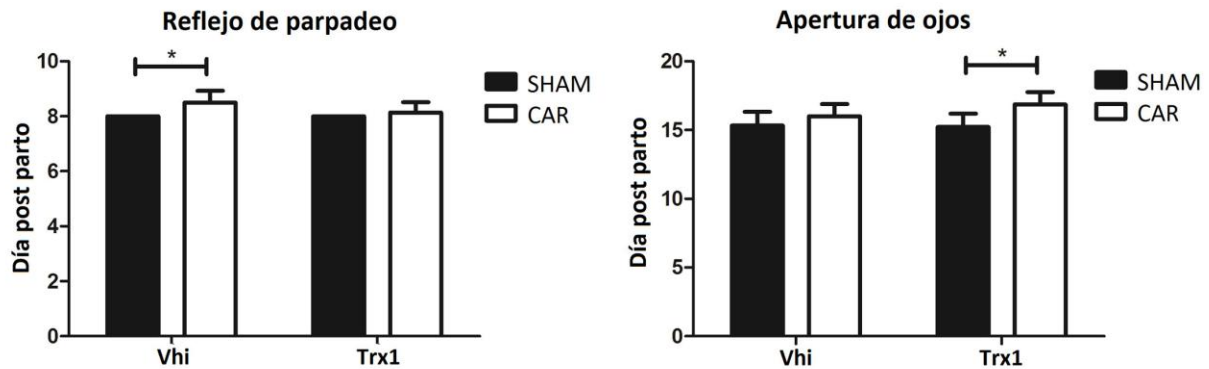


Figura 43: Cuantificación de los días en que los marcadores del desarrollo neuromuscular y neuroconductual aparecen en los distintos grupos experimentales. Las barras y barras de error muestran la media \pm DS de un total de 6 animales por grupo. Abreviaturas: SHAM, grupo control de cirugía; CAR, grupo carótida; Vhi, Vehículo.

*Diferencias significativas entre grupos SHAM y CAR ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

1 LA HI GENERA DAÑO A LARGO PLAZO EN LA RETINA DE MURINOS

Como ya ha sido mencionado, el SNC es particularmente vulnerable a la HI (Seo y col. 2013). Trabajos previos basados en los efectos de la HI sobre diversas áreas del SNC dan cuenta de las modificaciones que sufre este tejido luego de un evento hipóxico-isquémico, incluyendo neurodegeneración, pérdida neuronal y astrogliosis (Bernert y col. 2003, Saraceno y col. 2010). El impacto de la HI sobre el SNC no es homogéneo, siendo algunas poblaciones neuronales más susceptibles que otras. Por ejemplo, se sabe que luego de un evento hipóxico-isquémico algunas sub-poblaciones neuronales mueren mientras que otras sobreviven (Laptook y col. 1994, Thompson y col. 1995). Este fenómeno, conocido como vulnerabilidad selectiva, ocurre en neuronas de áreas tales como el hipocampo, cerebelo, estriado, tálamo y neocortex (Bernert y col. 2003).

Van Erp y col. (2002) ha reportado una reducción del volumen del hipocampo en sujetos que habían sufrido un insulto hipóxico-isquémico perinatal y que, décadas más tarde, desarrollaron esquizofrenia o presentaron síntomas esquizoides. El grupo de Reneman y Aronica (Schiering y col. 2014) estudiaron muestras de hipocampo de infantes fallecidos como consecuencia de una HI perinatal, y encontraron daño neuronal y la presencia de gliosis reactiva. Asimismo, investigaciones realizadas por el equipo liderado por Herrera-Marschitz han demostrado que el hipocampo de ratas sometidas a HI perinatal es una de las áreas más afectadas. Entre las alteraciones descriptas se destacan la pérdida neuronal, particularmente en el giro dentado, y el

aumento de la neurogénesis (Morales y col. 2007). En un modelo con roedores, Morales y col. (2008) describieron un aumento en la apoptosis en el *cornus ammonius* 1 y 3 (CA1 y CA3, respectivamente) y el giro dentado (GD) del hipocampo, así como un incremento de la neurogénesis en GD, transcurrida una semana desde la inducción de una AP. Incluso, a los 30 días posteriores al evento hipóxico-isquémico, los autores aún pudieron observar apoptosis en CA3 y proliferación celular en el GD. También observaron altos niveles del promotor de muerte asociado a Bcl-2 (BAD; del inglés *Bcl-2-associated death promoter*), a partir de lo cual los autores aducen que existe una muerte celular tardía en animales sometidos a AP. En otro estudio en murinos se ha observado una reducción del número de neuronas GABAérgicas, junto con una disminución en el comportamiento social, tras un evento de HI (Vázquez-Borsetti y col. 2016). Bernert y col. (2003) reportaron un aumento de GFAP en el cerebelo y el área CA1 del hipocampo en ratas sometidas a AP, utilizando el mismo modelo de asfixia perinatal empleado en el presente trabajo de tesis. A su vez, en el mismo trabajo, se encontró un aumento de pérdida neuronal en el cerebelo, estriado y núcleo ventrolateral del hipocampo. Estudios realizados en ratas Wistar de 7 días post natales, utilizando el mismo modelo de AP, han demostrado la presencia de daño neuronal en las áreas CA2 y CA3 del hipocampo (Spasojevic y col. 2013). Trabajos realizados por nuestro grupo han reportado cambios en la morfología y daño neuronal, junto con un aumento de la gliosis reactiva, en el hipocampo y el cerebelo en ratas adultas sometidas a AP (Saraceno y col. 2010, Campanille y col. 2015).

Los escasos trabajos que estudiaron los efectos de la HI perinatal sobre la retina, encontraron cambios morfológicos y aumento de la expresión de GFAP en dicho tejido

a los 15 días post-natales (Rey-Funes y col. 2013; Rey-Funes y col. 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se encuentran en concordancia con lo descrito por Rey-Funes y col. (2013; 2010). Al igual que en otras áreas del SNC, la retina presenta pérdida neuronal y un aumento de gliosis reactiva, sin embargo observamos que estas modificaciones no son homogéneas, encontrándose restringidas a algunas capas de la retina y a tipos celulares específicos (Fig. 19-23). Estos resultados nos permiten hipotetizar que la gliosis reactiva, observada en las diferentes capas de la retina, se debe a un aumento de tamaño de las células gliales (evidenciado por el aumento de GFAP) y no a un aumento de su número, ya que el marcador de células gliales MCT4 no presentó cambios (Fig 21 y 24). Por otro lado, nuestros resultados demuestran que las células ganglionares y las del epitelio pigmentario retiniano son las más afectadas tras una HI perinatal (Fig. 19 y 22). Las células ganglionares son neuronas cuyos axones forman el nervio óptico, el cual lleva la información capturada por los fotorreceptores hacia el centro de procesamiento de la información visual. Como tal, estas neuronas son de gran importancia en el circuito de la visión y se encuentran sujetas a una alta demanda metabólica (Fahy y col. 2016), lo que las hace más susceptibles a la HI. Por otro lado, las células del epitelio pigmentario son células diferenciadas, cuyo estado metabólico es indicativo del bienestar celular y su metabolismo oxidativo se encuentra relacionado con la diferenciación de las mismas (Adijanto y col. 2014). Por su ubicación entre la retina neural y el suministro coroideo de sangre, estas células juegan un papel esencial en la regulación metabólica de la retina (Adijanto y col. 2014). Por este motivo podrían ser altamente susceptibles a cambios

ocasionados por la HI y modificaciones en su metabolismo, causados por dicho evento, podrían generar cambios deletéreos en la retina.

2 HIPOXIA-REOXIGENACIÓN EN CÉLULAS ARPE-19

La ARPE-19 es una línea celular muy utilizada en el estudio de distintas retinopatías, como ser la retinopatía diabética, oclusión vascular de la retina, desprendimiento de retina y retinopatía del prematuro, en las cuales la hipoxia es uno de los agentes causales más frecuentes (Liu y col. 2016). Con el fin de determinar los efectos de la hipoxia y la posterior reoxigenación sobre células de la retina de mamíferos, se eligió trabajar con una línea celular establecida representativa del EPR (epitelio pigmentario retiniano), el EPR es una de las capas que observamos se encontraba más afectada por la HI.

Durante los últimos años la línea celular ARPE-19 se ha convertido en una de las más utilizadas con fines de investigación de patologías asociadas a la retina (Kuznetsova y col. 2014). Esta línea presenta un cariotipo normal y expresa marcadores específicos del epitelio pigmentario retiniano (Dunn y col. 1996). Las propiedades de estas células dependen de las condiciones de cultivo y la forma en la que son mantenidas. Por este motivo en el presente trabajo se han utilizado células ARPE-19 originales entre los pasajes 15 y 20, cuando forman una capa epitelial uniforme con morfología típica de adoquines (Kuznetsova y col. 2014). Células con más pasajes pierden esta estructura y comienzan a adquirir una morfología más elongada (Kuznetsova y col. 2014).

Se observó que las células ARPE-19 responden frente a la hipoxia aumentando los niveles de HIF1 α (Forooghian y col. 2007), del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y de la eritropoyetina (EPO), entre otros (Seong y col. 2015; Wang y col.). Liu y col. (2016) reportó un aumento mayor al 50% en los niveles de HIF-1 α en células ARPE-19 en condiciones de hipoxia, comparado con los niveles observados en condiciones de normoxia. Por otro lado, se ha demostrado que esta línea celular es susceptible al estrés provocado por un desbalance en el estado *redox* celular, lo cual fue evidenciado por la disminución de la viabilidad celular frente a un tratamiento con H₂O₂ (Alizadehy col., 2001). También se sabe que las células ARPE-19 responden a distintos estímulos cambiando su fenotipo hacia células retinianas de tipo neuronal, caracterizado por un cambio en la morfología celular y la expresión de marcadores neuronales (Carr y col. 2011, Chen S. y col. 2003).

En nuestros estudios pudimos determinar que una hipoxia de 24 h no produjo cambios en la viabilidad/proliferación de las células ARPE-19 sin embargo, sí observamos una disminución de la misma durante la reoxigenación (Fig. 30). Es posible que los efectos causados por la hipoxia ya descritos, como el aumento de HIF1 α , comiencen a generar cambios en la viabilidad/proliferación celular luego de las 24 h. Asimismo, resulta plausible que el mayor cambio en la viabilidad/proliferación celular ocurra durante la etapa de reoxigenación, tal como lo hallado en este trabajo de tesis, ya que durante esta etapa se producen la mayor cantidad de especies reactivas y el daño celular que, en última instancia, son los que conducen hacia la apoptosis (Edwards y col. 2000; Johnston y col. 2011; Singh y col. 2014). También estudiamos

los efectos que tiene la hipoxia y la posterior reoxigenación sobre la morfología de las células ARPE-19. Los resultados del análisis morfológico indicaron que las células ARPE-19 perdieron algunas de sus características fenotípicas. Encontramos una morfología alargada y desordenada perdiendo el rasgo distintivo de un epitelio, en forma de adoquin, similar a lo que ocurre tras 20 pasajes (Fig. 29). Esto sugeriría una relación entre estos cambios y el estado de diferenciación de las células ARPE-19 cuando son sometidas a hipoxia y reoxigenación, ya que se sabe que presentan cambios en la diferenciación frente a ciertas situaciones de estrés (Alizadeh y col 2001). Esto nos llevó a analizar distintos marcadores de diferenciación celular y de células diferenciadas maduras, con el fin de establecer a nivel molecular la diferenciación celular observada.

GFAP además de ser un marcador de células gliales, es un marcador de diferenciación neuronal temprana en adultos (Liu y col. 2010). Pudimos observar que los valores de este marcador se encuentran elevados en células ARPE-19 expuestas tanto a hipoxia como a reoxigenación. Por otro lado, también utilizamos como marcador un activador transcripcional que se encuentra involucrado en la vía de formación de células ganglionares tempranas, NeuroD1, observando una clara disminución de los niveles de este marcador durante hipoxia, agudizándose durante la reoxigenación (Fig. 31 y 32). También se observó un aumento de los niveles de MCT4 (Fig. 31 y 32), la cual se ve expresada en células gliales (Bergersen y col. 2015), y no se ven cambios en los niveles de neurofilamento. Esto nos llevó a plantearnos la posibilidad de que el aumento de GFAP no signifique un giro temprano hacia la diferenciación neuronal sino hacia una diferenciación glial. A partir de estos resultados, nos interesó descifrar cuál

es el papel que juegan las tiorredoxinas de interés en estos cambios sobre la proliferación y la diferenciación de células del epitelio pigmentario retiniano.

3 PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE LAS TRX EN LA RETINA DE MURINOS

Trabajos previos han descripto los mecanismos moleculares que subyacen a la HI y la posterior reoxigenación, así como los cambios en el balance *redox* celular debido a un evento hipóxico-isquémico (los detalles moleculares de lo que ocurre en las células se encuentran recopilados en la sección 3 de la Introducción) (Alonso-Alconada y col. 2012, Zhao B. y col. 2012). La retina es el tejido con más alto consumo de oxígeno en el cuerpo, además de encontrarse constantemente expuesto a foto oxidación, haciéndolo un gran generador de ROS (Li y col. 2012). Durante condiciones isquémicas se produce un desbalance entre la cantidad de ROS producidos en la retina y la capacidad del sistema para disminuir la cantidad de estas especies reactivas (Li y col. 2012). Éstas son las razones por las cuales en el presente trabajo de tesis nos planteamos analizar la participación de un grupo de proteínas ubicuas que poseen gran poder reductor.

Como se ha mencionado con anterioridad, la retinopatía del prematuro (RDP) es una de las principales consecuencias de la HI perinatal. El 50% de los casos de ceguera infantil ocurridos en 1950 se debieron a RDP. Ese porcentaje decrece abruptamente cuando se descubre que la falta de oxígeno es un factor de riesgo y se comienza a usar oxígeno suplementario como tratamiento (Li y col. 2012). Las condiciones hipóxicas en la retina disparan una oleada de producción de ROS que favorecen la neovascularización por medio de la activación de JAK/STAT y

HIF1 α /VEGF (Li y col. 2012). Efectivamente, Arduini y col. (2014) demostró que, frente a HI, en la retina existe un aumento de HIF1 α junto con un cambio en el tipo de metabolismo, que pasa de aerobio a anaerobio. Asimismo, se ha comprobado que frente a un evento hipóxico las células del EPR aumentan la expresión de HIF1 α , Nf κ B y de aductos marcadores de daño celular causado por un desbalance *redox* (Cervellati y col. 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis que también son parte del atlas de las TRX (Aon-Bertolino y col. 2011) en retina de ratas Sprague-Dawley, el cual forma parte de este trabajo de tesis (Fig. 25) como en el realizado en ratón (Godoy y col. 2011) demuestran que la localización de las TRX difiere para cada una de las proteínas de esta familia en las distintas capas de la retina. En este trabajo decidimos enfocarnos en el estudio de algunas de estas proteínas, las cuales llamaron nuestra atención por dos razones: 1) Trx1 y Trx2 se encuentran mayoritariamente expresadas en la capa de células ganglionares, una de las capas que hemos comprobado se encuentra más afectada por la HI perinatal; 2) Nr x es una redoxina poco estudiada, estrechamente relacionada con la diferenciación celular. Otra de las capas más afectadas por la HI es el EPR, cuyas células se desdiferencian y vuelven a diferenciarse de acuerdo a sus niveles de estrés o a su estado metabólico (Adijanto y col. 2014) sobre el cual la redoxina Nr x puede estar jugando un papel importante, ya que estaría involucrada en eventos de diferenciación celular (Funato y col. 2007) que en esta capa celular son producto del estrés.

4 TRX1, TRX2 Y NRX FRENTE A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

4.1 TRX1 FRENTE A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

Trx1 es la primera TRX descrita y en la actualidad se le conocen una gran cantidad de funciones, sin embargo aún no se sabe cuál es el rol que juega en la HI tanto como proteína meramente reductora de grupos sulfuro, como dentro de la señalización *redox* que ocurre durante este proceso. Se ha demostrado que la actividad de Trx1 se encuentra elevada en pulmones de ratones expuestos a hipoxia crónica mientras que la expresión de dicha proteína se encuentra incrementada en células de musculo liso de arterias pulmonares de animales expuestos a hipoxia (Chen y col. 2013).

En el presente trabajo de tesis observamos que los niveles de Trx1 disminuyen en las retinas de animales sometidos a HI bajo los dos modelos estudiados (Fig. 26-27), indicando que Trx1 podría estar jugando un papel importante en la cascada de eventos que se disparan luego de una HI. Sin embargo, la disminución en la expresión de esta redoxina no se condice con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en otras áreas del SNC. Romero y col. (2015) ha constatado un aumento de los niveles de Trx1 en el hipocampo de ratas de 30 días de edad que habían sido sometidas a ligadura de carótida a los 7 días post-natales. Asimismo, los estudios realizados por Romero y col. (2015) en una línea de neuroblastos ponen en evidencia la importancia de esta redoxina para mantener el fenotipo neuronal frente a un evento hipóxico-isquémico. En principio nos resulta difícil conciliar las diferencias entre los resultados obtenidos entre ambas líneas de investigación. Sin embargo, una de

nuestras hipótesis reside en el hecho de que la retina se encuentra compuesta por tipos celulares totalmente diferentes a los presentes en el hipocampo, que tienen requerimientos metabólicos y una producción de especies reactivas distintos a los presentes en las neuronas y astrocitos hipocampales. Estas diferencias en el metabolismo y en la producción de ROS y RNS podrían ser parte de la razón por la cual los niveles de Trx1 permanecen reducidos a largo plazo. Mediante el estudio de la expresión de Trx1 en una línea celular establecida de EPR (células ARPE-19) hemos podido determinar cómo se modifican los niveles de esta redoxina frente a un evento de hipoxia-reoxigenación. Como se ha descrito previamente, los niveles de Trx1 durante la hipoxia se ven elevados, sin embargo, a medida que transcurren los días desde la reoxigenación, estos valores decrecen hasta llegar a los niveles de expresión normales (Fig. 34). Este comportamiento en células de EPR podría explicar los resultados obtenidos en los modelos animales a largo plazo. Es posible que durante el evento de HI los niveles de Trx1 se vean efectivamente elevados y que luego disminuyan por debajo de lo normal, permaneciendo así hasta, por lo menos, los 30 días post-natales.

Los efectos de Trx1 sobre la proliferación celular se encuentran bastante estudiados en diversas condiciones y modelos. Se conoce su acción positiva sobre la proliferación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Song y col. 2011). Por otro lado, el silenciamiento de Trx1 genera una disminución de la proliferación de células de músculo liso de arterias pulmonares, la cual se ve aumentada frente a un evento hipóxico asociado a un aumento de Trx1 (Chen y col. 2013). Li y col. (2012) propone que la proliferación estimulada por Trx1 en células B3

epiteliales de lente humana estaría mediada por NFkB y a su vez ésta sería independiente de las vías de ERK y PI3K.

Con el fin de estudiar los efectos que tiene la hipoxia sobre la proliferación celular utilizamos la línea ARPE-19. Como ya se mencionó, observamos que la hipoxia no generó cambios sobre la proliferación de estas células, sin embargo, la posterior reoxigenación disminuyó significativamente la viabilidad/proliferación celular. Al estudiar las TRX en esta línea, encontramos que el silenciamiento de Trx1 produjo un aumento significativo de la viabilidad/proliferación de estas células. Estos resultados no se condicen con lo reportado para otros tipos celulares, donde el aumento de Trx1 durante la hipoxia se encontraba asociado a un aumento de la proliferación (Chen y col. 2013, Song y col. 2011, Li. y col. 2012). No obstante, estos cambios en la proliferación en las células ARPE-19 podrían ser explicadas por la presencia de otra redoxina que parece estar jugando un papel de suma importancia sobre estas células durante la hipoxia: Nrj. Más aún, centrándonos en los efectos generados por Trx1, nos resulta llamativo que si bien al silenciar esta redoxina los niveles de viabilidad/proliferación aumentan, cuando se elevan sus niveles debido a la hipoxia, no se ven cambios en la proliferación en células ARPE-19. De todos modos si se ve un mayor aumento de Trx1 a las 24 h de reoxigenación que van de la mano con una disminución de la proliferación (Tabla 2). Nuestros resultados indicarían que en células ARPE-19 Trx1 está ejerciendo un papel contrario al que se observa en la bibliografía existente*. Es por esto que nos ha interesado estudiar el papel que juega Nrj en la viabilidad/proliferación celular, con el fin de dilucidar las bases que subyacen a esta aparente discrepancia.

*La cual indica que frente una disminución de Trx1 hay una disminución de la proliferación.

Hipoxia	Aumenta Trx1	No hay cambios en proliferación
Reoxigenación	Aumenta más Trx1	Disminuye proliferación
Silenciamiento de Trx1	Disminuye Trx1	Aumenta proliferación

Tabla 2: Comparación de niveles de Trx1 y cambios en la proliferación frente a hipoxia, reoxigenación y silenciamientos de Trx1

Con el fin de determinar cuál es el papel que juega Trx1 en estas células se analizó también si la ausencia de esta redoxina es capaz de generar cambios en la morfología celular. Se observó que frente al silenciamiento de Trx1, las células ARPE-19 presentan un fenotipo más grande y alargado, acompañado por un aumento de la cantidad de nanotúbulos de actina (Fig. 38), los cuales se encuentran relacionados con estrés celular (Marzo y col. 2012). Los cambios en el fenotipo celular son similares a los que se observan frente a hipoxia y reoxigenación. Nuevamente nos encontramos frente al hecho de que vemos el mismo fenómeno frente al silenciamiento y durante la hipoxia, en la cual valores de esta redoxina se encuentran elevados. Haciendo énfasis en que existen además otros factores que están jugando un papel de gran relevancia en las modificaciones causadas por la hipoxia y la reoxigenación en esta línea celular, lo cual no resulta sorprendente ya que durante estos eventos se pone en juego una gran maquinaria de señalizaciones moleculares (detalladas en la sección 3 de la Introducción).

A su vez, se analizaron los cambios que se producen en los marcadores de diferenciación (GFAP, MCT4, NeuroD1 y NF(p)), analizados anteriormente también frente a hipoxia-reoxigenación. De forma similar a lo que ocurre frente a una hipoxia, al silenciar Trx1 se ve un aumento de GFAP. Sin embargo, no se pudieron observar cambios significativos en los niveles de NeuroD1, NF(p) y MCT4 (Fig.40). Estos

resultados nos llevan a hipotetizar que los cambios que ocurren tras el silenciamiento de Trx1 se encuentran relacionados con el estrés celular que esta modificación estaría provocando, asemejándose a las observadas en células tras hipoxia y reoxigenación. En ambos casos, la célula se enfrentaría a mayores niveles de especies reactivas y a un desbalance *redox* que, en última instancia, llevaría a cambios de viabilidad/sobrevida, morfología y diferenciación. El aumento de Trx1 frente a hipoxia y reoxigenación puede ser una respuesta a corto plazo del sistema para responder a los cambios ocasionados por la falta de oxígeno.

4.2 TRX2 FRENTE A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

Trx2 es una proteína de pequeño tamaño que, al igual que el resto de las tiorredoxinas, juega un papel importante en la viabilidad celular y en la regulación de la apoptosis (Tanaka y col. 2002), además de ser una proteína esencial durante el desarrollo embrionario (Li y col. 2012). Es por ello que estudiamos los cambios sobre Trx2, ya que es una proteína muy similar a Trx1 y cuya particularidad es su localización mitocondrial. En algunos casos las acciones de Trx1 y Trx2 se encuentran solapadas. Como se mencionó en la sección anterior, en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo tanto Trx1 como Trx2 favorecen la proliferación celular (Song y col. 2011). Sin embargo, hay casos en los que Trx2 tiene funciones diferenciales a Trx1 e incluso puede tener efectos opuestos. Zhou y col. (2007) describió que la sobreexpresión de Trx2 atenúa el aumento de HIF1 α asociado a un evento hipóxico, mientras que Trx1 ejerce el efecto contrario. En este estudio, Trx1 facilitó la acumulación de HIF1 α por activación de Akt, p70S6K y eIF-4E las cuales controlan la traducción dependiente de Cap, mientras que Trx2 se encuentra atenuando la actividad

de estas proteínas y produciendo un aumento de ROS. Por otro lado, la oxidación producida por diferentes metales asociada con la activación de ASK1 y apoptosis afecta de manera diferencial a Trx1 y Trx2, siendo esta última la más afectada (Hansen y col. 2006).

En un modelo de glaucoma en ratas Wistar, se ha podido observar que los niveles de Trx1 disminuyen dos semanas luego de la inducción del daño y que este cambio se vuelve más pronunciado alrededor de la quinta semana (Lillig y col. 2007). Sin embargo, al estudiar Trx2 en este modelo no se aprecian cambios en sus niveles de expresión.

De los datos anteriormente comentados resulta evidente que la HI no genera cambios en la expresión de esta redoxina en las retinas de ratas Sprague-Dawley, tanto aquellas expuestas a asfixia perinatal como a ligadura de carótida. Esto está en concordancia con resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo que no encontró diferencias en la expresión de Trx2 en hipocampos de ratas sometidas a ligadura de carótida y posterior anoxia/reoxigenación (Romero y col. 2015). Al analizar lo que ocurre en células ARPE-19 tampoco se pudo apreciar cambios significativos en la expresión de esta redoxina frente hipoxia o reoxigenación. De todos modos decidimos analizar si el silenciamiento de Trx2 generaba cambios en la viabilidad/proliferación y la morfología de las células ARPE-19. Como se reporta en los resultados, el silenciamiento de Trx2 no afectó de forma significativa la viabilidad/proliferación de células ARPE-19 (Fig. 36), pero se observó un leve aumento en el número de nanotúbulos de actina (Fig. 38), indicativo de estrés celular*. Esto resultados nos conducen a pensar que el papel que juega Trx2 en estas células no es

*Estrés celular debido a la transfección o a la disminución de la capacidad antioxidante de la célula.

importante en términos de fenotipo celular, tanto frente a un evento hipóxico como a su posterior reoxigenación. Más aún, su silenciamiento parece afectar a la célula de forma mucho menos significativa que el silenciamiento de Trx1.

4.3 NRX FRENTE A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

Nrx es una redoxina, descubierta por Kurooka y col. (1997), sobre la cual aún no se han realizado muchos estudios. El gen de la nucleoredoxina fue descubierto mientras se buscaban nuevos genes cerca del locus del gen *nude* (Funato y col. 2007). A esta proteína se la denominó nucleoredoxina ya que su secuencia aminoacídica es similar a la de las tioredoxinas y a que su expresión es predominantemente nuclear en células COS-7. Sin embargo, más adelante se comprobó que en otros tipos celulares Nrx es una proteína mayoritariamente citosólica (Funato y col. 2007). Sus dos residuos de Cys son esenciales para su actividad óxido reductasa, al igual que en las Trx (Funato y col. 2007).

Entre los blancos de acción de Nrx se encuentra NFkB, cuya actividad transcripcional se ve estimulada por esta redoxina por vías aún no identificadas y CREB, cuya actividad se ve aumentada frente a la presencia de Nrx (Funato y col. 2007, Hirota y col. 2000). La expresión de Nrx bloquea la señalización de la vía Wnt/B-catenina, la cual está asociada al mantenimiento de células madre, morfogénesis temprana y supervivencia celular (Funato y col. 2006, Funato y col. 2010).

En el presente trabajo de tesis hemos podido observar que los niveles de Nrx aumentan en las retinas de animales sometidos a HI, tanto en aquellos que han sufrido asfixia perinatal como aquellos expuestos a ligadura de carótida. Este resultado indica

que Nr_x juega un papel importante durante la HI y que los cambios que ocurren en la regulación de la expresión de esta redoxina parecen mantenerse hasta treinta días después de transcurrido el evento hipóxico-isquémico. Los altos niveles de Nr_x luego de una HI podrían estar relacionados con una respuesta del sistema al aumento en la producción de especies reactivas como consecuencia del evento hipóxico-isquémico. Si bien estos resultados son opuestos a los observados para Trx1, nos hemos planteado la hipótesis de que estas redoxinas se estarían balanceando en referencia a su capacidad antioxidante. Mediante el estudio de la expresión de Nr_x en células ARPE-19 hemos podido examinar cómo se modifican los niveles de esta redoxina frente a un evento de hipoxia-reoxigenación. Al igual que con Trx1, los valores de Nr_x son elevados durante la hipoxia y las primeras 24 h de reoxigenación.

Los efectos que tiene Nr_x sobre la proliferación celular no han sido tan estudiados como los de Trx1. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se sabe que Nr_x es un regulador negativo de la vía de Wnt/ β catenina, la cual se encuentra estrechamente relacionada con la viabilidad celular. Funato y col. (2006) describió que el silenciamiento de Nr_x utilizando ARN de interferencia resulta en un aumento de la proliferación celular en la línea HEK293.

Como ya hemos mencionado, la hipoxia en sí misma no genera cambios sobre la proliferación de estas células. Sin embargo, la posterior reoxigenación generó una disminución significativa de la viabilidad/proliferación celular. Asimismo, tras el silenciamiento de Nr_x observamos una disminución significativa de la viabilidad/proliferación de estas células. Estos resultados no se condicen con los encontrados por el grupo de Miki (Funato y col. 2006) obtenidos en células HEK293.

Sin embargo, consideramos que la disminución de la viabilidad/proliferación observada en las células silenciadas para Nr_x en realidad se deba también a un efecto de Trx1, y no solo al silenciamiento de Nr_x. De hecho, a partir de estos resultados se podría hipotetizar la existencia de un balance generado por la expresión de estas dos redoxinas en condiciones normales que frente a un cambio de expresión de las mismas se perdería, generando los cambios observados.

Hipoxia	Aumenta Nr _x	No hay cambios en proliferación
Reoxigenación	Aumenta más Nr _x	Disminuye proliferación
Silenciamiento de Nr_x	Disminuye Nr _x	Disminuye proliferación

Tabla 3: Comparación de niveles de Nr_x y cambios en la proliferación frente a hipoxia, reoxigenación y silenciamientos de Nr_x.

Con el fin de determinar cuál es el papel que juega Nr_x en estas células se analizó también cómo la ausencia de esta redoxina es capaz de afectar la morfología celular. De esta manera, fue posible observar que frente al silenciamiento de Nr_x las células ARPE-19 presentaron un fenotipo más grande y alargado, mientras que se pudo observar un aumento de la cantidad de nanotúbulos de actina, de la misma forma que cuando se silenció Trx1 (Fig. 38). Hasta aquí los cambios en el fenotipo celular son similares a los que se observan frente a hipoxia y reoxigenación, sin embargo cuando se analizó la morfología de las células ARPE-19 en una matriz tridimensional se pudo observar un fenotipo ampliamente modificado. Las ARPE-19 no solo pierden la forma redondeada que se presentan en una matriz tridimensional, sino que además exhiben largas proyecciones y adquieren una forma estrellada, similar a la de ciertas neuronas

o astrocitos. Nuevamente, estos resultados pueden parecer contradictorios con el hecho de que la morfología celular se modifica frente a la hipoxia y que durante este evento los valores de Nr_x aumentan^{*1}. Sin embargo, estos datos brindan aún más pruebas de la complejidad del sistema de las tiorredoxinas, así como de los eventos que subyacen a la hipoxia y dirigen nuestro interés hacia mecanismos de regulación de estas redoxinas, que se encuentran modificados durante una hipoxia y su posterior reoxigenación.

A continuación se analizaron los cambios que se producen en los marcadores de diferenciación analizados anteriormente frente a hipoxia y reoxigenación (GFAP, MCT4, NeuroD1, NF(p)). De forma similar a lo que ocurre frente a una hipoxia, al silenciar Nr_x se produjo un aumento de GFAP y una disminución de NeuroD1 (Fig. 40). No obstante, no se pudieron observar cambios significativos en los niveles de MCT4 y NF(p). Estos resultados indicarían que frente a la ausencia de Nr_x las células ARPE-19 estarían diferenciándose, posiblemente hacia un fenotipo astrocitario^{*2}. Esto es coincidente con los resultados obtenidos en el análisis morfológico en tres dimensiones, en el cual se pudo observar que estas células adquieren una forma similar a la que presentan las células astrocitarias (Fig. 39). Sin embargo, una vez más estos datos parecen no coincidir con los obtenidos en células sometidas a hipoxia y reoxigenación, llevándonos a hipotetizar que los cambios que ocurren debido al silenciamiento de Nr_x, al igual que con Trx1, se encuentran relacionados con el estrés celular que esta modificación estaría provocando. Nuevamente, la célula se enfrentaría a mayores niveles de especies reactivas y a un desbalance *redox* que en última instancia llevaría a cambios de viabilidad/sobrevivencia, morfología y diferenciación. Sin

^{*1}Es posible que este aumento también sea una respuesta del sistema a los cambios en la morfología celular que ocurren frente a la HI.

^{*2}El desbalance *redox* genera que Nr_x se disocie de Dlv bloqueando la actividad de la vía de Wnt, la cual evita que la célula se diferencie (Funato y col. 2010).

embargo, resulta de suma importancia resaltar que la presencia de Nr_x en estas células es esencial para mantener su fenotipo epitelial, ya que al silenciarlo se perdería por completo. Más aún, frente a la ausencia de esta redoxina las células del epitelio pigmentario retiniano comenzaron a adquirir un fenotipo claramente más semejante al de astrocitos o neuronas.

A pesar de que los resultados hasta aquí obtenidos pueden resultar contradictorios, nos resulta cada vez más evidente que la hipoxia genera cambios moleculares muy similares a los que ocurren frente al silenciamiento de Trx1 y Nr_x. Es por esto que planteamos que el aumento de estas redoxinas durante la hipoxia podría ser una respuesta que contrarreste los cambios que se producen durante la misma. Se sabe que las células ARPE-19 pueden diferenciarse frente a un daño o estrés, que en estos casos puede ser tanto la hipoxia y la reoxigenación como el silenciamiento de redoxinas. Frente a hipoxia y reoxigenación ocurre un aumento de especies reactivas, mientras que al silenciar Trx1 o Nr_x, disminuye la capacidad del sistema para balancear la producción normal de ROS y RNS, por lo cual también se vería un aumento de las mismas y por lo tanto un incremento del estrés celular. Sin embargo, descifrar en detalle esta fina modulación requiere de estudios más exhaustivos sobre la regulación de la expresión de las tiorredoxinas y los cambios que esta expresión produce.

5 POSIBLES TERAPIAS

En el día de hoy el cuidado neonatal y la sobrevida luego de un evento de HI han aumentado significativamente, sin embargo la RDP continua siendo una de las

mayores causas de ceguera en recién nacidos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Li y col. 2012).

Hasta el presente se han planteado diversas terapias con el fin de suprimir los efectos causados por la HI perinatal, entre ellas la más utilizada hasta el momento es la hipotermia. Sin embargo, ninguna de las terapias estudiadas ha sido 100% exitosa y su funcionamiento depende del correcto diagnóstico de una HI antes del parto y de un rápido accionar luego del evento hipóxico-isquémico.

Debido a que se ha probado previamente que la nicotinamida protege contra un desbalance redox, injuria isquémica e inflamación, Morales y col.(2010) plantea el uso de este compuesto como tratamiento post-HI, demostrando su efectividad para disminuir la muerte neuronal y las consecuencias neuroconductuales de la AP.

En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar los efectos que puede tener una de las redoxinas estudiadas como agente terapéutico frente a la HI. Nos enfocamos en el estudio de Trx1 ya que es la proteína perteneciente a la familia de las TRX más estudiada y aquella sobre la que ya hay antecedentes con respecto a su actividad neuroprotectora en retinas de animales sometidos a distintos modelos de daño (Hanschmann y col. 2011).

Nuestros resultados indican que el tratamiento post-HI con Trx1 disminuye los efectos provocados por el evento hipóxico-isquémico, tanto a nivel celular como a nivel del neurodesarrollo. La disminución de los valores de GFAP, en animales sometidos a ligadura de carótida y tratados con Trx1 una hora post anoxia con respecto a aquellos inyectados con solución salina, es claro indicativo de que el tratamiento con dicha

redoxina podría ser beneficioso frente a los daños generados por la HI (Fig.41). Por otro lado, cabe mencionar que no se vieron diferencias en los niveles de NF, indicando que la reversión del daño ocasionado no fue completa. Por otro lado, también se pudo ver una restitución de los cambios observados a nivel del neurodesarrollo: aquellos animales que fueron sometidos a HI y tratados con Trx1 presentan el reflejo de parpadeo a los 8 días, al igual que los controles SHAM (Fig. 43). De todas formas, al igual que con los resultados bioquímicos, los resultados fisiológicos nos dan la pauta de que el daño no se ve revertido por completo, ya que el tratamiento con Trx1 no logra restituir la edad en la que los animales que fueron expuestos a HI abren los ojos por primera vez, indicando que aún se mantiene un retraso del desarrollo ocular.

A pesar de que los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis presentan evidencias de que Trx1 posee cierta acción terapéutica contra los efectos causados por la HI, estos no son de ninguna forma concluyentes. Por lo tanto nos hemos planteado la realización de más estudios utilizando esta redoxina como agente terapéutico. Entre las nuevas pruebas se incluirían diferentes dosis de Trx1, diferentes esquemas de administración con más de una dosis post-HI y el análisis de su efecto en otros tejidos del SNC.

CONCLUSIONES

1 CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis pudimos observar que el tejido retiniano de animales expuestos a HI perinatal presenta diversas alteraciones. Entre estas modificaciones, podemos mencionar un aumento en el grosor de diversas capas, una marcada astrogliosis y una disminución del número de células ganglionares. Por otro lado observamos una disminución en la expresión de Trx1 y un aumento en los niveles de Nr1 en retinas expuestas a HI. A su vez pudimos determinar que la hipoxia y la posterior reoxigenación generan cambios en la morfología, viabilidad/proliferación y expresión de GFAP (marcador de células gliales) y NeuroD1 (marcador de diferenciación neuronal temprana) en células ARPE-19, indicando una disminución de la supervivencia debida a la reoxigenación y una posible diferenciación hacia una estirpe glial. Estos cambios se encontraron acompañados por modificaciones en los niveles de Trx1 y Nr1.

Si bien frente a la falta de Nr1 se ve un aumento de GFAP, que podría estar indicando una diferenciación glial, se pueden ver los mismos efectos frente a un hipoxia-reoxigenación (en la cual los niveles de Nr1 aumentan), esto nos lleva a, sospechar que la HI es capaz de generar una diferenciación glial en células del epitelio pigmentario retiniano, pero que este cambio no está relacionado de forma directa con Nr1. Incluso se podría hipotetizar que su aumento frente a una HI es una forma que presenta el sistema para revertir los cambios en la diferenciación celular desencadenados por la HI.

Con respecto a Trx1 observamos juega un rol fundamental sobre la viabilidad/proliferación de células del epitelio pigmentario retiniano. Al igual que con Nr1 el aumento de Trx1 en células expuestas a hipoxia y reoxigenación puede ser una respuesta celular que permita mantener los niveles de viabilidad/proliferación.

Con respecto al tratamiento de animales expuestos a HI con Trx1 pudimos ver una reversión de la astrogliosis medida por GFAP y una mejora en los defectos en el desarrollo del ojo ocasionados por esta injuria, lo cual nos ha llevado a concluir que la administración de Trx1 presenta efectos benéficos en la retina de animales sometidos a HI.

Está de más decir que estas redoxinas y el resto de los miembros de la familia de las tioredoxinas se encuentran implicados en diversas funciones y en complejas redes de señalización. Es por dicho motivo que se requiere un mayor número de estudios para poder elucidar cual es el papel exacto que juegan en la retina de mamíferos sometida a HI, para lo cual nuestros resultados permiten plantear nuevas hipótesis que permitirán la continuación del análisis de estas proteínas no solo en la retina sino también en otras áreas del SNC.

BIBLIOGRAFÍA

1 BIBLIOGRAFÍA

J. Adijanto, N.J. Philp, Cultured primary human fetal retinal pigment epithelium (hfRPE) as a model for evaluating RPE metabolism, *Exp. Eye Res.* 126 (2014): 77-84.

P. Ahnelt, H. Kolb, Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity, *J Comp Neurol.* 343 (1994): 387-405.

M. Alizadeh, M. Wada, C.M. Gelfman, J.T. Handa, L.M. Hjelmeland, Downregulation of differentiation specific gene expression by oxidative stress in ARPE-19 cells, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001): 2706-2713.

M.M.H. Al-Gayyar, M.A. Abdelsaid, S. Matragoon, B.A. Pillai, A.B. El-Remessy, Thioredoxin interacting protein is a novel mediator of retinal inflammation and neurotoxicity, *Br. J.Pharmacol.*, 164 (2011): 170-180.

D. Alonso-Alconada, E. Hilario, F.J. Álvarez, A. Álvarez, Apoptotic cell death correlates with ROS overproduction and early cytokine expression after hypoxia-ischemia in fetal lambs., *Reprod. Sci.* 19 (2012): 754-63.

S. Ansari, H. Azari, D.J. McConnell, A. Afzal, J. Mocco, Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice., *J. Vis. Exp.* (2011): 8-11.

J.Arduini, M. Escobar, R. Vento, G. Escrig, J. Quintás, O.D. Sastre, Saugstad, R. Solberg, Metabolic adaptation and neuroprotection differ in the retina and choroid in a piglet model of acute postnatal hypoxia., *Pediatr Res.* 76(2014):127-34.

L. H. Bergersen, Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body–brain interaction. *Jour of Cer Blood Flow & Metab* 35 (2015): 176-185.

G. Bernert, H. Hoeger, W. Mosgoeller, D. Stolzlechner, B. Lubec, Neurodegeneration, neuronal loss, and neurotransmitter changes in the adult guinea pig with perinatal asphyxia, *Pediatr. Res.* 54 (2003): 523-528.

Berndt, C.H. Lillig, A. Holmgren, Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783 (2008): 641-650.

K. Bjelke, S.O. Andersson, P. Ogren, Asphytic lesion: proliferation of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission, *Brain Res.* 543 (1991): 1-9.

E. Blanco, P. Galeano, M. Holubiec, J.I. Romero, T. Logica, P. Rivera, F.J. Pavón, J. Suarez, F. Capani, F Rodriguez de Fonseca. Perinatal asphyxia results in altered expression of the

hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats, *Front Neuroanat.* 9 (2015): 141.

V.L. Bonilha, Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro, *Exp. Eye Res.* 126 (2014): 38-45.

S. Boulos, B.P. Meloni, P.G. Arthur, C. Bojarski, N.W. Knuckey, Peroxiredoxin 2 overexpression protects cortical neuronal cultures from ischemic and oxidative injury but not glutamate excitotoxicity, whereas Cu/Zn superoxide dismutase 1 overexpression protects only against oxidative injury, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007): 3089–3097.

V. Campanille, G.E. Saraceno, S. Rivière, T. Logica, R. Kölliker, F. Capani, R. Castilla, Long lasting cerebellar alterations after perinatal asphyxia in rats, *Brain Res. Bull.* 116 (2015): 57–66.

F. Capani, C.F. Loidl, F. Aguirre, L. Piehl, G. Facorro, A. Hager, T. De Paoli, H. Farach, J. Pecci-Saavedra, Changes in reactive oxygen species (ROS) production in rat brain during global perinatal asphyxia: An ESR study, *Brain Res.* 914 (2001): 204–207.

F. Capani, G.E. Saraceno, V. Botti, L. Aon-Bertolino, D. Madureira de Oliveira, G. Barreto, P. Galeano, L.D. Giraldez-Alvarez, H. Coirini, Protein ubiquitination in postsynaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia, *Exp. Neurol.* 219 (2009): 404–413.

A.-J. Carr, A.A. Vugler, L. Yu, M. Semo, P. Coffey, S.E. Moss, J. Greenwood, The expression of retinal cell markers in human retinal pigment epithelial cells and their augmentation by the synthetic retinoid fenretinide., *Mol. Vis.* 17 (2011) 1701-1715.

F. Cervellati, C. Cervellati, a Romani, E. Cremonini, C. Sticozzi, G. Belmonte, F. Pessina, G. Valacchi, Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells., *Free Radic. Res.* 48 (2014): 303-312.

B. Chance, H. Sies, a Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs., *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527-605.

K.H. Cheeseman, T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bull.* 49 (1993): 481-493.

B. Chen, V.E. Nelin, M.L. Locy, Y. Jin, T.E. Tipple, Thioredoxin-1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 305 (2013): 389-395.

S. Chen, W. Samuel, R.N. Fariss, T. Duncan, R.K. Kutty, B. Wiggert, Differentiation of human retinal pigment epithelial cells into neuronal phenotype by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, *J. Neurochem.* 84 (2003): 972-981.

D.M. Dacey, M.R. Petersen, Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89 (1992): 9666-9670.

Davison, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 52 (1989): 1021.

H. de Groot, U. Rauen, Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review, Transplant. Proc. 39 (2007): 481-484.

L. Della Santina, D.M. Inman, C.B. Lupien, P.J. Horner, R.O.L. Wong, Differential progression of structural and functional alterations in distinct retinal ganglion cell types in a mouse model of glaucoma., J. Neurosci. 33 (2013): 17444-17457.

L.A. Del Río, ROS and RNS in plant physiology: An overview, J. Exp. Bot. 66 (2015): 2827-2837.

W.D. Dietrich, Neurobiology of stroke., Int. Rev. Neurobiol. 42(1998): 55-101.

K.C. Dunn, a E. Aotaki-Keen, F.R. Putkey, L.M. Hjelmeland, ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties., Exp. Eye Res. 62 (1996): 155-169.

T. Ebrey, Y. Koutalos, Vertebrate Photoreceptors, Prog. Retin. Eye Res. 20 (2001): 49-94.

A.D. Edwards, D.V. Azzopardi, Perinatal hypoxia-ischemia and brain injury, Pediatr Res 47(2000): 431-432.

E.T. Fahy, V. Chrysostomou, J.G. Crowston, Mini-Review: Impaired Axonal Transport and Glaucoma., Curr. Eye Res. 41 (2016): 273-283.

Feigenspan, N. Babai, Functional properties of spontaneous excitatory currents and encoding of light/dark transitions in horizontal cells of the mouse retina, Eur. J. Neurosci. 42 (2015): 2615-2632.

P. Ferrazzano, V. Chanana, K. Uluc, E. Fidan, E. Akture, D.B. Kintner, P. Cengiz, D. Sun, Age-dependent microglial activation in immature brains after hypoxia- ischemia., CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 12 (2013): 338-349.

F. Forooghian, R. Razavi, L. Timms, Hypoxia-inducible factor expression in human RPE cells., Br. J. Ophthalmol. 91 (2007) 1406-1410.

Y. Funato, T. Michiue, M. Asashima, H. Miki, The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled., Nat. Cell Biol. 8 (2006): 501-508.

Y. Funato, H. Miki, Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation, Antioxid. Redox Signal. 9 (2007): 1035-1057.

Y. Funato, H. Miki, Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin., Free Radic. Res. 44 (2010): 379-388.

B.B. Gao, X. Chen, N. Timothy, L.P. Aiello, E.P. Feener, Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy, *J. Proteome Res.* 7 (2008): 2516-2525.

P. Geigenberger, A.R. Fernie, Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants, *Antiox. Redox. Sig.* 21(2014): 1389-1421.

D.L. Gilbert, Keeping reactive oxygen species (ROS) in their proper place. *N Y Ann Acad Sci.* 738 (1994): 1-7.

J.R. Godoy, M. Funke, W. Ackermann, P. Haunhorst, S. Oesteritz, F. Capani, H.P. Elsässer, C.H. Lillig, Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810 (2011): 2-92.

E.-M. Hanschmann, J.R. Godoy, C. Berndt, C. Hudemann, C.H. Lillig, Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling., *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013): 1539-605.

J.M. Hansen, H. Zhang, D.P. Jones, Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006): 138-145.

H.A. Hansson, A. Holmgren, G. Norstedt, B. Rozell, Changes in the distribution of insulin-like growth factor I, thioredoxin, thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase during the development of the retina, *Exp. Eye Res.* 48 (1989): 411-420.

Hattori, Y. Takagi, H. Nakamura, K. Nozaki, J. Bai, N. Kondo, T. Sugino, M. Nishimura, N. Hashimoto, J. Yodoi, Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice., *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2004): 81-87.

J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism., *Trends in Biochem. Sci.* 39 (2014): 199-218.

H.J.K. Hawkes, T.C. Karlenius, K.F. Tonissen, Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: A study of functional and putative regulatory elements, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014): 303-314.

K. Hirota, M. Matsui, M. Murata, Y. Takashima, F.S. Cheng, T. Itoh, K. Fukuda, J. Yodoi, Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 (2000): 177-182.

Hofmann, H.J. Hecht, L. Flohe, Peroxiredoxins, *Biol. Chem.* 383 (2002): 347-364.

Y. Inomata, H. Nakamura, M. Tanito, A. Teratani, T. Kawaji, N. Kondo, J. Yodoi, H. Tanihara, Thioredoxin inhibits NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina, *J. Neurochem.* 98 (2006): 372-385.

J. Jia, A. Arif, F. Terenzi, B. Willard, E.F. Plow, S.L. Hazen, P.L. Fox, Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition, *Cell*. 159 (2014): 623-634.

M. V. Johnston, W.H. Trescher, A. Ishida, W. Nakajima, Novel treatments after experimental brain injury, *Semin. Neonatol.* 5 (2000): 75-86.

M. V Johnston, W.H. Trescher, A. Ishida, W. Nakajima, Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain., *Pediatr. Res.* 49 (2001): 735-41.

M. V. Johnston, A. Fatemi, M.A. Wilson, F. Northington, Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care, *Lancet Neurol.* 10 (2011): 372-382.

Y. Kabe, K. Ando, S. Hirao, M. Yoshida, H. Handa, Redox Regulation of NF- κ B Activation: Distinct Redox Regulation Between the Cytoplasm and the Nucleus, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005): 395-403.

T. Kalogeris, C.P. Baines, M. Krenz, R.J. Korthuis, Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298 (2012): 229-317.

P.-O. Koh, Proteomic analysis of focal cerebral ischemic injury in male rats., *J. Vet. Med. Sci.* 72 (2010) 181–5.

H. Kolb, K. a Linberg, S.K. Fisher, Neurons of the human retina: a Golgi study., *J. Comp. Neurol.* 318 (1992): 147-187.

H. Kolb, E. Fernandez, J. Schouten, P. Ahnelt, K. a. Linberg, S.K. Fisher, Are there three types of horizontal cell in the human retina?, *J. Comp. Neurol.* 343 (1994): 370-386.

H. Kolb, Roles of Amacrine Cells, *Webvision Organ. Retin. Vis. Syst.* (2005).

L. Kong, X. Zhou, F. Li, J. Yodoi, J. McGinnis, W. Cao, Neuroprotective Effect of Over Expression of Thioredoxin on Photoreceptor Degeneration in Tubby Mice, *Neurobiol. Dis.* 38 (2010): 446-455.

H. Kurooka, K. Kato, S. Minoguchi, Y. Takahashi, J. Ikeda, S. Habu, N. Osawa, A.M. Buchberg, K. Moriwaki, H. Shisa, T. Honjo, Cloning and Characterization of the Nucleoredoxin Gene That Encodes a Novel Nuclear Protein Related to Thioredoxin, *Genomics.* 39 (1997): 331-339.

V. Kuznetsova, A.M. Kurinov, M.A. Aleksandrova, Cell Models to Study Regulation of Cell Transformation in Pathologies of Retinal Pigment Epithelium, *J. Ophthalmol.* 2014 (2014).

T.C. Laurent, E.C. Moore, P. Reichard, Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli.*, *B. J. Biol. Chem.* 239 (1964): 3436-3444.

A.R. Laptook, R.J. Corbett, R. Sterett, D.K. Burns, G. Tollefsbol, D. Garcia, Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain, *Pediatr Res.* 35 (1994): 436-442.

J.H. Lee, K. Kim, E.H. Park, K. Ahn, C.J. Lim, Expression, Characterization and Regulation of a *Saccharomyces cerevisiae* Monothiol Glutaredoxin (Grx6) Gene in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol Cells*. 24 (2007): 316-322.

S. Li; Y. Wang; M.F. Lou, Thioredoxin 1 stimulates proliferation of human lens epithelial cells by activating NF-B pathway., *Invest. Ophth. & Vis. Sci.*, 53 (2012): 1067

S.Y. Li, Z.J. Fu, A.C.Y. Lo, Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2012).

Lillig, A. Holmgren, Thioredoxin and Related Molecules-From Biology to Health and Disease, *Antioxid. Redox Signal*. 10 (2007): 1344-1365.

X. Liu, J. Xie, Z. Liu, Q. Gong, R. Tian, G. Su, Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of retinal pigment epithelium cells under hypoxia and/or hyperglycemia, *Gene*. 580 (2016): 41-46.

Y. Liu, T. Namba, J. Liu, R. Suzuki, S. Shioda, T. Seki, Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus, *Neuroscience*. 166 (2010): 241-251.

F. López-Aguilera, M.G. Plateo-Pignatari, V. Biaggio, C. Ayala, A.M. Seltzer, Hypoxic preconditioning induces an AT2-R/VEGFR-2(Flk-1) interaction in the neonatal brain microvasculature for neuroprotection, *Neuroscience*. 216 (2012): 1-9.

J. Lu, A. Holmgren, Thioredoxin System in Cell Death Progression, *Antioxid. Redox Signal*. 17 (2012): 1738-1747.

J. Lu, A. Holmgren, The thioredoxin antioxidant system, *Free Radic. Biol. Med.* 66 (2014): 75-87.

J. Lu b, A. Holmgren, The Thioredoxin Superfamily in Oxidative Protein Folding, *Antioxid. Redox Signal*. 21 (2014): 457-470.

S. Levine, Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36(1960): 1-17.

O.V. Lushchak, M. Piroddi, F. Galli, V.I. Lushchak, Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species., *Redox Rep.* 19 (2014): 8-15.

A.P. Mariani, The Neuronal Organization of the Outer Plexiform Layer of the Primate Retina, *Int. Rev. Cytol.* 86 (1984): 285-320.

Marchal, V. Delorme-Hinoux, L. Bariat, W. Siala, C. Belin, J. Saez-Vasquez, J. P. Reichheld, NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Molecular Plant*, 7(2014): 30-44.

- L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage., *Carcinogenesis*. 21 (2000): 361–370.
- L. Marzo, K. Gousset, C. Zurzolo, Multifaceted Roles of Tunneling Nanotubes in Intercellular Communication., *Front. Physiol.*, 3 (2012): 72.
- P. Mergenthaler, U. Dirnagl, A. Meisel, Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models, in: *Metab. Brain Dis.*, 2004: pp. 151-167.
- D.A. Mitchell, M.A. Marletta, Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine, *Nat Chem Biol*. 1 (2005): 154-158.
- P. Morales, P. Huaiquin, D. Bustamante, J. Fiedler, M. Herrera-Marschitz, Perinatal asphyxia induces neurogenesis in hippocampus: An organotypic culture study, *Neurotox. Res.* 12 (2007): 81-84.
- P. Morales, J.L. Fiedler, S. Andrés, C. Berrios, P. Huaiquín, D. Bustamante, S. Cardenas, E. Parra, M. Herrera-Marschitz, Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008): 2650-2662.
- P. Morales, N. Simola, D. Bustamante, F. Lisboa, J. Fiedler, P.J. Gebicke-Haerter, M. Morelli, R.A. Tasker, M. Herrera-Marschitz, Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats, *Exp. Brain Res.* 202 (2010): 1-14.
- Y. Munemasa, J.H. Ahn, J.M.K. Kwong, J. Caprioli, N. Piri, Redox proteins thioredoxin 1 and thioredoxin 2 support retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma., *Gene Ther.* 16 (2009): 17-25.
- Y. Munemasa, J.M.K. Kwong, S.H. Kim, J.H. Ahn, J. Caprioli, N. Piri, Thioredoxins 1 and 2 protect retinal ganglion cells from pharmacologically induced oxidative stress, optic nerve transection and ocular hypertension., *Adv. Exp. Med. Biol.* 664 (2010): 355-363.
- Y. Munemasa, Y. Kitaoka, J. Kuribayashi, S. Ueno, Modulation of mitochondria in the axon and soma of retinal ganglion cells in a rat glaucoma model, *J. Neurochem.* 115 (2010): 1508-1519.
- J.K. Newcomb-Fernandez, X. Zhao, B.R. Pike, K.K. Wang, A. Kampfl, R. Beer, S.M. DeFord, R.L. Hayes, Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (2001): 1281-94.
- Pedone, D. Limauro, K. D'Ambrosio, G. De Simone, S. Bartolucci, Multiple catalytically active thioredoxin folds: A winning strategy for many functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010): 3797-3814.
- Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases, *Indian J. Clin. Biochem.* 30 (2015): 11-26.
- J.H.Prince, Comparative Anatomy of The Eye. Springfield, IL: Charles C Thomas., (1956).

W. a Pulsinelli, J.B. Brierley, F. Plum, Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia., *Ann. Neurol.* 11 (1982): 491-498.

W. a Pulsinelli, D.E. Levy, T.E. Duffy, Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia., *Ann. Neurol.* 11 (1982): 499-502.

P.G. Reddy, D.K. Bhuyan, K.C. Bhuyan, Lens-specific regulation of the thioredoxin-1 gene, but not thioredoxin-2, upon in vivo photochemical oxidative stress in the Emory mouse., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265 (1999): 345-349.

M. Rey-Funes, V.B. Dorfman, M.E. Ibarra, E. Peña, D.S. Contartese, J. Goldstein, J.M. Acosta, I.M. Larróyz, R. Martínez-Murillo, A. Martínez, C.F. Loidl, Hypothermia prevents gliosis and angiogenesis development in an experimental model of ischemic proliferative retinopathy, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (2013): 2836-2846.

M. Rey-Funes, M.E. Ibarra, V.B. Dorfman, E.M. López, J.J. López-Costa, H. Coirini, C.F. Loidl, Hypothermia prevents the development of ischemic proliferative retinopathy induced by severe perinatal asphyxia, *Exp. Eye Res.* 90 (2010): 113-120.

J.E. Rice, R.C. Vannucci, J.B. Brierley, The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat., *Ann. Neurol.* 9 (1981): 131-41.

R.W. Rodieck, The primate retina., *Comp. Primate. Biol.* 4 (1988): 203-78

J.I. Romero, E.M. Hanschmann, M. Gellert, S. Eitner, M.I. Holubiec, E. Blanco-Calvo, C.H. Lillig, F. Capani, Thioredoxin 1 and glutaredoxin 2 contribute to maintain the phenotype and integrity of neurons following perinatal asphyxia., *Biochim Biophys Acta.* 1850 (2015): 1274-85.

Rousselet, J. Kriz, N.G. Seidah, Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining., *J. Vis. Exp.* (2012): e4038.

M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono, H. Ichijo, Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.*, 17 (1998): 2596-2606.

L.M. Sandalio, M.C. Romero-Puertas, Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks, *Ann. Bot.* 116 (2015): 475-485.

G.E. Saraceno, M.L.A. Bertolino, P. Galeano, J.I. Romero, L.M. Garcia-Segura, F. Capani, Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia, *Exp. Neurol.* 223 (2010): 615-622.

A.M. Schiering, T.R. de Haan, J.-M.F. Niermeijer, J.H. Koelman, C.B.L.M. Majoie, L. Reneman, E. Aronica, Correlation Between Clinical and Histologic Findings in the Human Neonatal Hippocampus After Perinatal Asphyxia., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73 (2014): 324-34

H. Seo, K.H. Lim, J.H. Choi, S.M. Jeong, Similar neuroprotective effects of ischemic and hypoxic preconditioning on hypoxia-ischemia in the neonatal rat: A proton MRS study, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (2013): 616-623.

H. Seong, J. Ryu, J.Y. Jeong, I.Y. Chung, Y.S. Han, S.H. Hwang, J.M. Park, S.S. Kang, S.W. Seo, Resveratrol suppresses vascular endothelial growth factor secretion via inhibition of CXC-chemokine receptor 4 expression in ARPE-19 cells, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015): 1479-1484.

R. Shapley, V.H. Perry, Cat And monkey retinal ganglion cells and their visual functional roles., *Trends. Neurosci.*, 9(1986): 229-35

N. Singh, G. Sharma, N. Singh, K. Hanif, A comparative study of neuroprotective effect of single and combined blockade of AT1 receptor and PARP-1 in focal cerebral ischaemia in rat, *Int. J. Stroke.* 9 (2014): 560-568.

J.J. Song, J.G. Rhee, M. Suntharalingam, S.A. Walsh, D.R. Spitz, Y.J. Lee, Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress: Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂, *J. Biol. Chem.* 277 (2002): 46566-46575.

J.J. Song, Y.J. Lee, Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1, *Biochem. J.* 373 (2003): 845-853.

J.S. Song, H.H. Cho, B.-J. Lee, Y.C. Bae, J.S. Jung, Role of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 on proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells., *Stem Cells Dev.* 20 (2011) 1529–37.

S.D. Spasojevic, V.D. Stojanovic, N.A. Barisic, A.R. Doronjski, D.R. Zikic, S.M. Babovic, Neuroprotective effects of hypothermia and erythropoietin after perinatal asphyxia in newborn rats, *J Matern Fetal Neonatal Med.* 26 (2013): 1506-1509.

E.R. Stadtman, R.L. Levine, Protein oxidation., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2000): 191-208.

N. Sun, J.R. Hao, X.Y. Li, X.H. Yin, Y.Y. Zong, G.Y. Zhang, C. Gao, GluR6-FasL-Trx2 mediates denitrosylation and activation of procaspase-3 in cerebral ischemia/reperfusion in rats, *Cell Death Dis.* 4 (2013): e771.

Y. Takagi, A. Mitsui, A. Nishiyama, K. Nozaki, H. Sono, Y. Gon, N. Hashimoto, J. Yodoi, Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (1999): 4131-4136.

Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, G.M. Teasdale, Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1 (1981): 53-60.

Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, G.M. Teasdale, Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1 (1981): 61-69.

T. Tanaka, F. Hosoi, Y. Yamaguchi-Iwai, H. Nakamura, H. Masutani, S. Ueda, A. Nishiyama, S. Takeda, H. Wada, G. Spyrou, J. Yodoi, Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis, *EMBO J.* 21 (2002) 1695-1703.

M. Tanito, H. Masutani, H. Nakamura, A. Ohira, J. Yodoi, Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (2002): 1162-1167.

C.B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease., *Science* (80-.). 267 (1995): 1456-1462.

H. Tomimoto, I. Akiguchi, H. Wakita, J. Kimura, K. Hori, J. Yodoi, Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia., *Brain Research*, 625 (1993): 1-8.

H. Uchiyama, W.K. Stell, Association amacrine cells of Ramón y Cajal: rediscovery and reinterpretation., *Vis. Neurosci.* 22 (2005): 881-891.

Uria-Avellanal, N.J. Robertson, Na⁺/H⁺ Exchangers and Intracellular pH in Perinatal Brain Injury, *Transl. Stroke Res.* 5 (2014): 79-98.

J.D. Uys, P.J. Mulholland, D.M. Townsend, Glutathione and redox signaling in substance abuse., *Biomed. Pharmacother.* (2014): 1-9.

M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007): 44-84.

W.D. Van de Berg, C. Schmitz, H.W. Steinbusch, C.E. Blanco, Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: a combined TUNEL and stereological study, *Exp Neurol.* 174 (2002): 29-36.

T.G.M. Van Erp, P.A. Saleh, I.M. Rosso, M. Huttunen, J. Lönnqvist, T. Pirkola, O. Salonen, L. Valanne, V.P. Poutanen, C.G. Standertskjöld-Nordenstam, T.D. Cannon, Contributions of genetic risk and fetal hypoxia to hippocampal volume in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder, their unaffected siblings, and healthy unrelated volunteers, *Am. J. Psychiatry.* 159 (2002): 1514-1520.

R.C. Vannucci, Current and Potentially New Management Strategies for Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy, *Pediatrics.* 85 (1990): 961-968.

R.C. Vannucci, Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage, *Pediatr Res.* 27 (1990): 317-326.

R.C. Vannucci, S.J. Vannucci, Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model, *Dev. Neurosci.* 27 (2005): 81-86.

P. Vázquez-Borsetti, E. Peña, C. Rico, M. Noto, N. Miller, D. Cohon, J.M. Acosta, M. Ibarra, F.C. Loidl, Perinatal Asphyxia Reduces the Number of Reelin Neurons in the Prelimbic Cortex and Deteriorates Social Interaction in Rats, *Dev. Neurosci.* (2016).

H.E. Vuong, C.N. Hardi, S. Barnes, N.C. Brecha Parallel Inhibition of Dopamine Amacrine Cells and Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in a Non-Image-Forming Visual Circuit of the Mouse Retina. *J Neurosci.* 35(2015): 15955-15970.

Wang, C. Jie, X. Dai, Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia, *Rev. Neurosci.* 25 (2014): 255-268.

J. Wang, Z. Sun, J. Shen, D. Wu, F. Liu, R. Yang, S. Ji, A. Ji, Y. Li, Octreotide Protects the Mouse Retina against Ischemic Reperfusion Injury through Regulation of Antioxidation and Activation of NF- κ B. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, (2015): 970156.

Y. Wang, A. Sang, M. Zhu, G. Zhang, H. Guan, M. Ji, H. Chen, Tissue factor induces VEGF expression via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in ARPE-19 cells., *Mol. Vis.* 22(2016): 886-97.

C.W. Ward, B.L. Prosser, W.J. Lederer, Mechanical stretch-induced activation of ROS/RNS signaling in striated muscle., *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014): 929-36.

H. Wässle, Parallel processing in the mammalian retina, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004): 747-757.

H. Westerblad, D.G. Allen, Emerging Roles of ROS/RNS in Muscle Function and Fatigue, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011): 2487-2499.

X. Wu, L. Li, L. Zhang, J. Wu, Y. Zhou, Y. Zhou, Y. Zhao, J. Zhao, Inhibition of thioredoxin-1 with siRNA exacerbates apoptosis by activating the ASK1-JNK/p38 pathway in brain of a stroke model rats, *Brain Res.* 1599 (2015): 20-31.

Z.W. Ye, J. Zhang, D.M. Townsend, K.D. Tew, Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015): 1607-1621.

S. Ylä-Herttuala, Oxidized LDL and atherogenesis, in: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1999): 134-137.

H. Yokota, S.P. Narayanan, W. Zhang, H. Liu, M. Rojas, Z. Xu, T. Lemtalsi, T. Nagaoka, A. Yoshida, S.E. Brooks, R.W. Caldwell, R.B. Caldwell, Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (2011): 8123-8131.

Y. Yu, K. Xing, R. Badamas, C. a Kuszynski, H. Wu, M.F. Lou, Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells., *Free Radic. Biol. Med.* 57 (2013): 92-104.

Zahedi Avval, A. Holmgren, Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for mammalian S phase ribonucleotide reductase, *J Biol Chem.* 284 (2009): 8233-40.

Zhao, Y. Chen, X. Sun, M. Zhou, J. Ding, J.J. Zhan, L.J. Guo, Phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* rhizome protect against brain ischemia injury via regulation of GLT-1, EAAC1 and ROS generation, *Molecules*. 17 (2012): 2725-2737.

L. Zhou, D-Y. Zhu, Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications, *Nitric Ox*. 20 (2009) 223-230.

Zhou, M. Gomi, M. Fujimoto, M. Hayase, T. Marumo, H. Masutani, J. Yodoi, N. Hashimoto, K. Nozaki, Y. Takagi, Attenuation of neuronal degeneration in thioredoxin-1 overexpressing mice after mild focal ischemia, *Brain Res*. 1272 (2009): 62-70.

J. Zhou, A.E. Damdimopoulos, G. Spyrou, B. Brüne, Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia-inducible factor-1 α , *J. Biol. Chem*. 282 (2007): 7482-7490.

ABREVIATURAS

1 ABREVIATURAS

ACC.....	Arteria Carótida Común
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
AP.....	Asfixia Perinatal
ASK.....	Kinasa Reguladora de la Señalización de Apoptosis
CAR.....	Animal expuesto a ligadura de arteria carótida común
CTL.....	Animal control ROS Especies Reactivas del Oxígeno
CGL.....	Capa Ganglionar
CF.....	Capa de Fotorreceptores
CNE.....	Capa Nuclear Externa
CNI.....	Capa Nuclear Interna CPI Capa Plexiforme Interna
CPE.....	Capa Plexiforme Externa
Cys.....	Cisteína
Div.....	proteína <i>Dishevelled</i>
EPR.....	Epitelio Pigmentario Retiniano
Grx.....	Glutarredoxina
GSH.....	Glutación Reducido
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrógeno
HNO ₂	Acido Nitroso
HI.....	Hipoxia Isquemia

I κ B.....	Inhibidor del Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de Células B Activadas
NADPH.....	Nicotinamina Adenina Dinucleotido Fosfato Reducida
NF κ B.....	Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de Células B Activadas
NMDA.....	N-Metil-Aspartato
NO.....	Oxido Nítrico
NOS.....	Oxido Nítrico Sintetasa
NO ₂	Dióxido Nítrico
N ₂ O ₄	Tetróxido de Nitrógeno
Nrx.....	Nucleorredoxina
-ONOO.....	Peroxinitrito
•OH.....	Hidroxilo
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
¹ O ₂	Oxígeno Singlete
Prx.....	Peroxirredoxina
RNS.....	Especies Reactivas del Nitrógeno
-SH.....	Sulfhidrilo
SHAM	Animal expuesto a simulación de ligadura
TBP-2.....	Proteína que se une a Tiorredoxina -2
Trx.....	Tiorredoxina
TrxR.....	Tiorredoxina Reductasa
TGR.....	Glutatión Reductasa Especifica de Testículo
Wnt	proteína <i>Wingless-Related Integration Site</i>